BIOCOU

Lutte biologique contre la maladie du Court-noué de la Vigne : impact de l'intégration de techniques culturales impliquant des jachères en inter-culture et l'utilisation d'un porte-greffe résistant, sur les populations de nématodes ; compréhension du mode d'action des plantes couvre-sol a effet nématicide.

Biological control against fanleaf disease of Grapevine: implementation of cultural practices and fallows with antagonistic effects against the nematode vector of the virus, including the use of a resistant rootstock; towards deciphering the antagonistic mechanisms of the plant species used as fallows on the soil-borne nematodes, *Xiphinema index*

Programme Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides
APR 2014 « Résistances et pesticides : Résister aux bioagresseurs, vaincre les résistances au changement pour réduire les risques »
Rapport final - juin 2018

Adresse du laboratoire :
UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin (SVQV)
INRA, Université de Strasbourg
Equipe Virologie-Vection

Coordinateur du projet :
Olivier LEMAIRE
INRA Colmar,
28, rue de Herrlisheim
68021 Colmar Cedex France
olivier.lemaire@inra.fr

Date : 25/06/2018

N° de contrat : ECOPHYTO APR 2014 axe 3 BIOCOU
Date du contrat : 12/11/2015

Action pilotée par le Ministère chargé du développement durable, avec l'appui financier de l'Office national de l'eau et des milieux aquatiques, par les crédits issus de la redevance pour pollutions diffuses attribués au financement du Plan Ecophyto

Table des matières

Synthèse 4
Contexte général 5
Objectifs généraux du projet 7
Quelques éléments de méthodologie (et éventuelles difficultés rencontrées) 9
Principaux résultats obtenus : détaillés dans le rapport scientifique 10
Implications pratiques, recommandations, réalisations pratiques, valorisation 11
Partenariats mis en place, projetés, envisagés 12
Pour en savoir plus (quelques références) 13
Liste des opérations de valorisation issues du contrat (articles de valorisation, participations à des colloques, enseignement et formation, communication, expertises…) 15
Résumés 17
Résumé long 17
Mots-clés 20
Rapport scientifique 21
Matériel 28
1. Elutriation de terre d'élevage de *Xiphinema index* 28
2. Méthode de culture des fabacées 29
3. Exsudation de racines de fabacées 29
Méthodes 30
1. Extraction des parties aériennes et des racines de fabacées et de vigne 30
2. Extraction en phase solide des exsudats de fabacées 30
3. Analyse LC-MS 31
4. Analyse des données LC-MS. 32
5. Bioessais sur nématodes 33
Annexe : textes des publications 56
Résumés colloque de Virologie d'Aussois de janvier 2017 56
Publications scientifiques prévues 58

SYNTHESE

BIOCOU

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA MALADIE DU COURT NOUE DE LA VIGNE : IMPACT DE L'INTEGRATION DE TECHNIQUES CULTURALES IMPLIQUANT DES JACHERES EN INTER-CULTURE ET L'UTILISATION D'UN PORTE-GREFFE RESISTANT, SUR LES POPULATIONS DE NEMATODES ; COMPREHENSION DU MODE D'ACTION DES PLANTES COUVRE-SOL A EFFET NEMATICIDE

ECOPHYTO APR 2014 ONEMA « Résistance et Pesticides » axe 3

Coordinateur du projet : Olivier Lemaire, INRA Colmar

Ingénieure de Recherche en CDD sur Biocou : Lise Negrel, INRA Colmar

Autres partenaires scientifiques bénéficiaires : Christophe Bertsch, Université de Haute-Alsace, Colmar

CONTEXTE GENERAL

Quelle situation, quels enjeux motivent ce projet ?

Le court-noué est une maladie virale de la Vigne due principalement au GFLV (grapevine fanleaf virus), et entraînant un dépérissement du vignoble. Cette virose est inscrite depuis 2017 au Plan National du Dépérissement du Vignoble (PNDV). Elle est transmise par des nématodes du sol (*Xiphinema index* et *Xiphinema diversicaudatum*) qui piquent les racines des vignes pour s'alimenter et transmettent ainsi le virus s'ils sont eux-mêmes virulifères (porteurs du virus), ou bien l'acquièrent si la vigne est préalablement virosée. On appelle ainsi « potentiel infectieux » du court-noué, le pathosystème constitué du virus pathogène et de son nématode vecteur. Les nématodes se développent en suivant la croissance racinaire et peuvent vivre à de grandes profondeurs (jusqu'à 10 m de profondeur). Après arrachage de la vigne, ces nématodes ectoparasites sont capables de rester à l'état quiescent pendant 4 à 5 ans dans le sol, en absence de toute culture.

Avec l'évolution de la réglementation sur l'utilisation des produits phytosanitaires, la plupart des nématicides de synthèse et désinfectants de sol ont été interdits d'utilisation dans l'UE depuis 2009. Les seuls moyens actuellement disponibles pour lutter contre cette maladie sont, dans les parcelles sans court-noué, la prophylaxie par sélection et plantation de plants certifiés indemnes des virus du court-noué et, dans les vignobles infectés, la dévitalisation puis l'arrachage des ceps virosés, suivis de la mise au repos de la parcelle (jachère en inter-culture). Ces itinéraires techniques permettent de diminuer le potentiel infectieux du sol dû aux nématodes virulifères.

Des pistes alternatives sont à l'étude à l'INRA de Colmar depuis une dizaine d'années, et visent à combiner différents leviers d'action pour lutter contre la maladie du court-noué, avec en particulier l'utilisation de plantes à effet nématicide. Cette stratégie pourrait permettre d'économiser de 6 à 8 ans par rapport aux préconisations de jachère actuelles, en réduisant très efficacement le potentiel infectieux du sol sur un pas de temps d'environ 1 à 3 années, économiquement compatible avec les enjeux socio-économiques viticoles. La recherche de moyen de lutte contre le court-noué se focalise actuellement sur la recherche de cépages résistants (au virus par voie génétique et biotechnologique), l'utilisation de porte-greffes résistants (au nématode par voie génétique) et l'utilisation des plantes à effet nématicide. Des expérimentations en conditions contrôlées en serre et au vignoble ont montré que certaines plantes couvre-sol, notamment de la famille des Fabacées, avaient un effet antagoniste efficace vis-à-vis de *Xiphinema index*, le principal nématode vecteur du virus du court-noué (Villate 2013). Utilisées en jachère d'inter-culture, elles pourraient permettre de diminuer la durée de mise au repos avant replantation de la nouvelle vigne et par conséquent de limiter les pertes économiques associées. Le sainfoin et le lotier font partie des espèces candidates à l'étude.

Une autre voie de lutte alternative est l'incorporation dans le sol des produits d'origine biologique pouvant libérer des principes « bio-nématicides » dans les différents horizons du sol (on peut en effet retrouver le nématode vecteur à plus de 1 m de profondeur). Les granulés de sainfoin commercialisés par MULTIFOLIA (entreprise française, basée à Viâpres-le-Petit, et qui cultive et déshydrate le sainfoin), apparaissent comme de bons candidats pour lutter contre les nématodes du sol, du fait de leurs propriétés nématicides déjà mises en évidence dans le tractus digestif chez les ruminants. De nombreux résultats ont été publiés et diffusés à travers les projets « *HealthyHay* » et « *LegumePlus* » (consultation des résultats de ces projets sur le site www.sainfoin.eu) sur les propriétés antihelminthiques du sainfoin (Hoste *et al.*,2015 ; Klongsiriwet *et al.* 2015 et Quijada *et al.*, 2015). Les données issues de la thèse co-financée par MULTIFOLIA sur la caractérisation des granulés de sainfoin comme alicament en santé animale sont en cours de publication ou déjà publiés (Gaudin *et al.*, 2016). Une autre publication récente a été faite sur les propriétés antiparasitaires des granulés de sainfoin, résultats obtenus d'après les granulés fournis par MULTIFOLIA (Desrues *et al.*, 2016). L'effet anthelminthique du sainfoin contre *Ostertagia ostertagi* et *Cooperia oncophora* est attribué au contenu de ses parties aériennes en tanins condensés (Paolini *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une activité anthelminthique induite par une relation synergique entre des tanins condensés et un ou des métabolites secondaires émerge depuis quelques années. Cependant, si l'inhibition de l'activité anthelminthique des tanins est aisément obtenue en laboratoire par ajout de PVPP (qui précipite les tanins), l'identification de ces métabolites est complexe. Ainsi lors de l'étude comparative du potentiel nématicide des feuilles d'*Acaccia raddiana* et *d'Acaccia nilotica* Zabre *et al*., (2017) ont démontré que l'inhibition des tanins ne supprime pas entièrement le potentiel anthelmintique d'*Acaccia raddiana* contre *Haemonchus contortu*s, sans proposer l'identité de la molécule impliquée. Barrau *et al*., (2005) ont pu démontrer en analysant des extraits de sainfoin que son potentiel anthelminthique contre *Haemonchus contortus* été induit par les tanins condensés, mais également des flavanols glycosides, sans toutefois réussir à les identifier. Certaines molécules reconnues pour leur potentiel anthelmintique semble également améliorer l'activité antagoniste des tanins condensés. Il s'agit notamment de la lutéoline, la quercétine, la naringenine, la cinnamaldéhyde, la myricétine et le kaempferol (Klongsiriwet *et al*., 2015 ; Ropiak *et al*., 2016 ; Mengistu *et al*., 2017). En utilisant le même procédé dans l'objectif d'évaluer le potentiel nématicide de l'acacia et du sainfoin sur différents isolats d'*Haemonchus contortus*, Chan-Pérez *et al*., (2016) ont mise en lumière la complexité d'action de ces plantes, et la difficulté de les étudier . En effet, d'après leurs résultats le potentiel antagoniste de ces plantes apparaît « isolat-dépendant». Par exemple, les extraits de sainfoin ont montré un effet ovicide indépendamment de l'ajout de PVPP sur les isolats CENID, CAVR, FESC. Cependant, dans les mêmes conditions (extrait de sainfoin + PVPP) l'effet ovicide est renforcé sur l'isolat WHITE-RIVER. Dans le cas de l'isolat INRA d'*Haemonchus contortus*, l'ajout de PVPP réduit le potentiel ovicide du sainfoin.

Les molécules associées à ce potentiel effet nématicide des Fabacées ne sont pas encore identifiées, même si des hypothèses sur les composés impliqués ont été proposées. Ainsi les

travaux de quijada *et al.*, (2013), ont montré que des extraits de plantes contenant des saponines avaient un effet nématicide vis-à-vis des nématodes vecteurs des virus du court-noué (GFLV et ArMV).

Les travaux de recherche effectués sur le métabolome du sainfoin, en étroite interaction avec l'activité biologique de molécules candidates spécifiques des Fabacées sur *X. index*, représentent ainsi un enjeu essentiel, notamment pour comprendre le mécanisme d'action bio-nématicide de cette Fabacée. Ce projet vise également à consolider une filière naissante en France, dont majoritairement en Région Grand-Est, en créant de la valeur ajoutée sur le territoire grâce à la mise sur le marché de granulés déshydratés de sainfoin ou autres légumineuses à tanins condensés et molécules bio-nématicides à caractériser.

Enfin, sur le plan expérimental, et de livrables opérationnels auprès de la filière viti-vinicole, des expérimentations de terrains ont été proposées dans le cadre de Biocou selon deux modalités : la première est basée sur un réseau de parcelles expérimentales pré-existantes – réseau initié en 2009 lors de projets financés par FranceAgriMer et coordonnés par l'IFV (Marion Claverie). Les cinétiques de re-contamination par le virus du court-noué de parcelles hébergeant des dispositifs complémentaires et présentes dans le vignoble alsacien sont poursuivies.
La deuxième modalité, et en partenariat avec la société Multifolia, a consisté à la mise en place de nouveaux essais, intégrant parmi d'autres paramètres d'étude, l'adjonction de granulés de sainfoin, avant replantation. L'ensemble de ces expérimentations en vignoble, avec l'acquisition de connaissances plus fondamentales sur le mode d'action des espèces végétales à activité antagoniste sur les nématodes, devraient nous permettre d'identifier des itinéraires techniques innovants. En association avec les autres thématiques sur le court-noué, nous pourrons initier des essais systèmes pour valider des stratégies intégrées de gestion durable du court-noué et de répondre directement à la problématique du dépérissement dû au court-noué. Ces essais systèmes seront proposés et coordonnés avec le projet Vaccivine du PNDV (2018-2021), pour y introduire la composante du biocontrôle anti-viral par prémunition.

OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

Les travaux de Laure Villate (2013) ont consisté à suivre l'évolution de population de *X. index* en présence de différentes espèces de plantes couvre-sol en condition confinée. Les résultats obtenus, base du projet Biocou, ont mis en évidence le potentiel antagoniste des plantes de la famille des Fabacées (fig.1) sur une espèce de nématode vecteur du court-noué, *X. index*. Ces résultats ont été poursuivis dans le cadre du projet BIOCOU, et les expérimentations se sont focalisées sur trois Fabacées : le lotier corniculé, le trèfle violet et le sainfoin.
L'objectif principal du projet BIOCOU a consisté à analyser par LC-MS le contenu métabolomique de différents compartiments des plantes candidates, afin d'identifier le ou les

composés actifs et de tester l'effet direct de ces exsudats sur la mortalité du nématodes *Xiphinema index* par des bioessais en conditions contrôlées. Une analyse métabolomique comparative entre le métabolome des Fabacées et celui de la Vigne a permis de réduire à un nombre raisonnable les molécules à tester, seules et en combinaison.
L'identification de molécules bio-nématicides permettra de caractériser le mode d'action de ces plantes couvre-sol sur les nématodes vecteurs de virus. Nous pourrons ainsi proposer aux viticulteurs une gamme de plantes, capable d'avoir une action antagoniste efficace envers les nématodes, avec la mise en évidence éventuelle de nouveaux bio-nématicides. Par ailleurs, un essai combinant jachères couvre-sol/porte-greffe résistant Némadex AB permettra d'évaluer l'impact d'un itinéraire technique intégré sur la diminution du potentiel infectieux du sol. D'autres pratiques culturales, telles que l'enfouissement de plantes déshydratées (granulés en amendement organique), avant plantation et dans l'inter-rang, après plantation de la jeune vigne, pourront être envisagées. Enfin, la pluri-annualité des essais permettra d'estimer la durabilité de la résistance de cet itinéraire technique par analyse des cinétiques de re-contamination, entre essais et témoins. Enfin, il pourrait être intéressant d'exploiter les espèces spontanées de la famille des Fabacées (sainfoin sauvage …) présentes dans les vignobles, pour que ces couverts de service puissent aussi provenir de services éco-systémiques locaux.
Les différentes actions des 24 mois du projet ont été initialement définies comme suit :

Action 1 : choix et culture des plantes antagonistes (Année 1)

- Tâche 1.1 : Choix des plantes à tester
- Tâche 1.2 : Germination des graines et culture des plantes couvre-sol
- Tâche 1.3 : Récolte des exsudats

Action 2 : analyse des exsudats (Années 1 et 2)

- Tâche 2.1 : Analyse qualitative et quantitative de la composition des exsudats (chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse)
- Tâche 2.2 : Choix des molécules d'intérêt identifiés dans les exsudats
- Tâche 2.3 : Quantification des molécules d'intérêt dans le sol de culture des plantes à effet nématicide

Action 3 : analyse de l'effet des exsudats sur les nématodes (Année 2)

- Tâche 3.1 : Test d'effet des exsudats bruts sur la mortalité des nématodes
- Tâche 3.2 : Test d'effet des molécules d'intérêt sur la mortalité des nématodes

Action 4 : évaluation de l'effet de combinaisons plantes couvre-sol/Nemadex AB sur les populations de nématodes dans le sol (essai déjà implanté) (Année 2)

- Tâche 4.1 : Prélèvement de nématodes dans le sol
- Tâche 4.2 : Analyse de la diversité des populations de nématodes (analyse de microsatellites)
- Tâche 4.3 : Cinétiques comparatives de recontamination par le GFLV - durabilité de la protection conférée par l'association d'une résistance au nématode et à une jachère antagoniste (Année 2 - Année 5)

Notre projet a effectivement démarré en juin 2016, avec les premières analyses ELISA de l'action 4.3 et l'action 1 durant l'été 2016, et avec le recrutement effectif de Lise Negrel (CDD Ingénieure de Recherche spécialisée en métabolomique, sur projet à partir de septembre 2016). Biocou a bénéficié d'un soutien fort de la filière « Sainfoin » en particulier par un financement de MULTIFOLIA qui nous permet de poursuivre ce projet jusqu'en octobre 2018.

QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

Le sainfoin est la première espèce végétale, de la famille des Fabacées, dont nous abordons l'étude dans le projet BIOCOU. Les exsudats et extraits racinaires de sainfoin (variété *Perly*) sont analysés en LC-MS (ESI et APCI) et comparés au profil métabolomique de la variété de vigne très sensible au court-noué, le porte-greffe *SO4*. Les 18 métabolites détectés intensément dans les exsudats et les racines de plantes couvre-sol et non détectés dans les extraits de SO4 sont en cours d'identification. L'effet nématicide des molécules identifiées et disponibles dans les catalogues des fournisseurs de produits biochimiques, est ensuite testé lors de *bioessais* (confrontation *in vitro* avec des nématodes et définition des doses létales). L'effet nématicide des molécules non commercialisées ou non-identifiées pourrait être étudié après fractionnement des échantillons par *LC-MS/ITRAQ* (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*) à l'INRA de Villenave-d'Ornon dans le laboratoire d'Axel Marchal. Pour l'instant, nous n'avons pas eu encore besoin d'avoir recours à cette stratégie, compte-tenu des actions en cours et en particulier les bioessais (très chronophages) durant lesquels nous rencontrons des problèmes récurrents (voir compte-rendu complet).
Les bioessais aqueux consistent en la préparation de solutions à concentration connue des molécules d'intérêts dans lesquels on dépose un nombre connu de nématodes *élutriés* (*X. index* isolés). La mortalité des nématodes est ensuite suivie et notée durant plusieurs jours. L'impact du pH des solutions aqueuses sur la survie des nématodes a été analysé. Il en résulte que les pH acides entrainent une mortalité accrue des nématodes. Cette information doit être prise en compte lors de ces bioessais aqueux. Un solvant adapté à la survie des nématodes doit également être identifié afin d'évaluer l'effet nématicide des molécules peu solubles dans l'eau.
Les bioessais sur sol consistent à répandre la solution d'intérêt sur 50 g de terre d'élevage de nématodes (*X. index* provenant des élevages sur racines de figuiers – nématodes non virulifères). Les nématodes sont ensuite *élutriés* et le taux de mortalité est estimé sur l'observation des cent premiers nématodes isolés. Le protocole utilisé actuellement n'est pas complétement au point et des moisissures peuvent apparaitre au bout de quelques jours, pouvant remettre en question la validité des bioessais.

Ainsi, l'une des plus grandes difficultés de ce projet a été d'effectuer les bioessais malgré la propagation d'un parasite fongique nématophage entrainant une chute des populations de nématodes. Ce champignon apparaît dès 24h après le début des bioessais. Les nématodes deviennent « collants », et leur apparence extérieure est granuleuse. Très rapidement, les nématodes gonflent, et des hyphes percent ensuite leur cuticule extérieure et produisent des spores. La dissémination du nematoparasite semblent s'effectuer soit avant sporulation, lors d'un contact entre nématode sain et malade, soit après sporulation par entrée des spores dans le nématode via ses orifices. Cette difficulté majeure pour l'évaluation des propriétés biologiques des molécules identifiées, pourrait être au contraire exploitée pour envisager

l'utilisation d'un agent microbien de biocontrôle des nématodes. Des analyses moléculaires (clonage et séquençage des ADN 16S) sont en cours pour identifier cette espèces.

PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS : détaillés dans le rapport scientifique

Mise au point de la méthode de culture du sainfoin.

L'impact du substrat de croissance et de la méthode de culture sur le rendement racinaire du sainfoin a été étudié afin d'identifier les meilleures conditions de culture en serre. La culture hydroponique entraine un important développement des racines en dehors de substrat solide, et semblait donc être la méthode de culture la plus adaptée à la récolte et l'étude du métabolome des racines. Cependant, les fabacées se caractérisent par leur symbiose racinaire avec des bactéries du sol (rhizobium) pour former des nodosités pour la fixation de l'azote inorganique. Cette symbiose se caractérise par la formation de nodulations, et des modifications métabolomiques au niveau des racines, ce qui pourrait avoir un effet significatif sur la production des molécules à effet nématicide. N'étant pas adaptée à l'établissement de cette symbiose, la culture hydroponique a été abandonnée. Concernant le substrat de croissance, les plants de sainfoin cultivés dans de la *pouzzolane* ou du sable produisent une plus grande quantité de racines. Le sable a finalement été retenu, en raison de son faible coût, mais également de la facilité avec laquelle il peut être séparé des racines. La méthode de culture sélectionnée pour cultiver le sainfoin est donc en pot, dans un substrat sable (60 %) et terre avec rhizobium (40 %), provenant de parcelles de monoculture de sainfoin en Champagne, avec une alternance jour/nuit (16/8) et à 20°C.

Analyse de l'effet nématicide des exsudats de sainfoin en conditions contrôlées.

Le potentiel nématicide des exsudats de sainfoin a été évalué lors de bioessais aqueux et de bioessais sur sol. Les premiers bioessais aqueux ont été effectués sur des exsudats racinaires de plants, de cinq à douze semaines. D'après les résultats obtenus, les exsudats présentent un effet nématicide à partir de neuf semaines.

Lors des bioessais aqueux, les exsudats provoquent jusqu'à 20 % de mortalité (6 % de mortalité dans l'eau). Un premier protocole de bioessai en sol a été testé, mais les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence un effet nématicide des exsudats dans ces conditions. Il est probable que le sol entraine une dispersion ou une adsorption des molécules responsables de cet effet. Les derniers essais en boite de pétri ont été concluants. Les boites de pétri ont été percées à l'aide d'une aiguille, ce qui à favorisé les échanges gazeux, diminué la propagation des mycéliums, tout en limitant la perte d'humidité.

Premières analyses métabolomiques des exsudats et des extraits racinaires.

L'analyse métabolomique des exsudats racinaires, des extraits racinaires et des extraits des nodulations racinaires, a été effectuée par LC-MS après extraction au méthanol et au chloroforme, pour caractériser les molécules polaires et apolaires. Ces solvants offrent une vue d'ensemble du métabolome des échantillons. Le méthanol permet l'extraction des

molécules polaires du métabolisme secondaire, tandis que les molécules apolaires sont récupérées dans la phase chloroforme. Les premières analyses ont principalement montré la richesse de ces échantillons en flavonoïdes. Certaines saponines (hédéragénine, soyasapogénol, acide médicagénique…) et certains tanins (catéchine, épicatéchine, procyanidines…) ont été recherchés mais n'ont été que peu ou pas détectés dans les exsudats et les racines de sainfoin.

Expérimentations en vignoble

Le suivi des recontaminations par le virus du court-noué des 2 parcelles alsaciennes de Bernardswiller (Bas-Rhin) et de St Pierre (Bas-Rhin) montre qu'au bout de 2 années de jachère avec Luzerne et Vesce velue, le potentiel infectieux de la parcelle est toujours bien présent. Les premières contaminations des jeunes vignes par le virus du court-noué apparaissent dès la première année. A Bernardswiller, où la seule modalité de l'essai est l'utilisation d'une Fabacées en couvert de service pendant 2 années, et malgré la dévitalisation des ceps de l'ancienne vigne par herbicide, les cinétiques de recontamination sont statistiquement similaires entre les modalités. A St Pierre, où nous rajoutons l'utilisation du porte-greffe Nemadex AB résistant au nématode avec la jachère de Fabacées, il semble y avoir au bout de la 3eme année moins de contamination, qu'avec les autres modalités. Ce résultat très préliminaire, et que nous espérons conforter par les analyses pluriannuelles à venir, indique déjà qu'une solution intégrée doit être envisagée pour espérer lutter efficacement contre ce dépérissement, majeur en Champagne et dans beaucoup de vignobles historiques.

IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

La profession, les viticulteurs, la filière viti-vinicole en particulier champenoise, les interprofessions, CIVC, CIVA…, des entreprises privées, Multifolia, Jouffray-Drillaud, Moët et Chandon…, l'Union Champagne… sont très intéressés par cette approche et mettent à disposition des parcelles viticoles atteintes de court-noué pour nos futurs essais sur le terrain en ce qui concerne la filière. Les privés comme les entreprises Multifolia et Jouffray-Drillaud financent déjà la suite de Biocou (8 mois en 2018) et souhaitent renforcer leur effort de financement pour la poursuite en CDD de l'ingénieure recrutée initialement sur Biocou, sur la poursuite des questions de recherche développées dans le rapport scientifique.

- Recommandations et limites éventuelles :

Cinétiques de re-contamination, temps long, projets pluri-annuels, récurrence des financements.
Envisager d'utiliser un nématode « modèle » pour les bioessais et le screening des molécules issues des Fabacées, voire d'autres espèces.

- Réalisations pratiques et valorisation :

Sur le plan de la réalisation d'essais en vignoble pour tester de nouveaux itinéraires techniques, et en complément des essais jachères en place, un épandage, avant replantation des pieds de vigne, de granulés de sainfoin produits par la société Multifolia, a été effectué le 4 avril 2017. Ce dispositif « bloc » permettra de suivre la cinétique de re-contamination des jeunes vignes par le court-noué durant au moins 5 ans, en comparant les modalités traitées et non traitées, suivant ou non une jachère avec une fabacées (luzerne).
Une douzaine d'essais combinant plusieurs itinéraires techniques dont l'épandage de granulés de sainfoin sont prévus à partir de 2018 en Champagne.

Sur le plan de la communication et de la vulgarisation, journées « Sainfoin » en 2017 … Présentations à la profession, Moët …

Sur le plan scientifique, un poster présentant le projet BIOCOU et les premiers résultats obtenus, a été présenté lors des 16èmes Rencontres de Virologie Végétale à Aussois (15-19 janvier 2017). Perspectives de valorisation par 2 articles en préparation …

PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETES, ENVISAGES

Les granulés de sainfoin apparaissent comme de bons candidats pour diminuer les populations des nématodes du sol, du fait de leurs propriétés nématicides déjà mises en évidence dans le tractus digestif chez les bovins, et lors de nos premiers bioessais *in vitro* évaluant leur propriété bionématicide vis-à-vis de *X. index*. L'apport de granulés de sainfoin dans les sols correspond à une démarche innovante et complémentaire des études en santé animale. Cette approche a été envisagée par Multifolia en collaboration avec le Comité Champagne et l'INRA de Colmar en 2017 et 2018. Les propriétés vis-à-vis des nématodes du sol, responsables du court-noué restent cependant à confirmer en conditions de laboratoire et d'utilisation grandeur nature en parcelles. Les premiers essais conduits dans l'équipe ViVe à l'INRA de Colmar, montrent que les granulés de sainfoin ont un effet nématicide vis-à-vis du vecteur du virus du court-noué (*Xiphinema index*) dans les conditions de tests en laboratoire. Des bioessais ont ainsi été effectués au laboratoire avec des extraits aqueux de sainfoin à différentes concentrations pour évaluer la survie des nématodes directement en contact avec la solution aqueuse. Cette phase de tests a permis d'observer une mortalité des nématodes à 100% dès 24 heures d'immersion et de déterminer la concentration optimale en granulés de sainfoin pour observer ces effets (entre 3 et 10T/ha). Des tests complémentaires ont montré un effet lié à la saisonnalité quant à la sensibilité des nématodes aux substances nématicides provenant des granulés de sainfoin, ainsi que la teneur différentielle du sainfoin en tanins condensés et flavonoïdes en fonction des périodes de coupes du sainfoin. Cet effet sera à prendre en compte dans la poursuite des travaux initiés dans le cadre du projet BIOCOU. Nous prévoyons en effet de poursuivre ce projet au-delà de BIOCOU avec comme partenaire technique et financier la société Multifolia et potentiellement la maison de sélection de

plantes de service et de jachère, Jouffray-Drillaud. Nous envisageons d'autres sources de co-financements en répondant aux appels à projet du PNDV, des Ministères, des Régions, des interprofessions dans les mois à venir.

POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., & Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) on the in vitro larval migration of Haemonchus contortus: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology,* 131*(4), 531-538.*

Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., & Mathieu, C. (2016). In vitro susceptibility of ten Haemonchus contortus isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary parasitology,* 217*, 53-60.*

Desrues, O., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Mueller-Harvey, I., Enemark, H. L., & Thamsborg, S. M. (2016). Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on in vitro anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology*, *143*(4), 444-454.

Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, J. F., Lespine, A., & Hoste, H. (2016). Efficacy of sainfoin (Onobrychis viciifolia) pellets against multi resistant Haemonchus contortus and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Veterinary parasitology*, *227*, 122-129.

Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., ... & Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, *212*(1-2), 5-17.

Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., & Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of Haemonchus contortus exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *5*(3), 127-134.

Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J. P., Hendriks, W. H., & Pellikaan, W. F. (2017). The in vitro anthelmintic properties of browse plant species against Haemonchus contortus is determined by the polyphenol content and composition*. Veterinary parasitology,* 237*, 110-116.*

Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of Trichostrongylus colubriformis and Teladorsagia circumcincta in goats. *Veterinary Research,* 34*(3), 331-339.*

Pensec, F., Marmonier, A., Marchal, A., Gersch, S., Nassr, N., Chong, J., ... & Bertsch, C. (2013). Gypsophila paniculata root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *19*(3), 439-445

Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., & Hoste, H. (2015). Anthelmintic activities against Haemonchus contortus or Trichostrongylus colubriformis from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(28), 6346-6354.

Ropiak, H. M., Ramsay, A., & Mueller-Harvey, I. (2016). Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *121*, 225-231.

Villate, L., Morin, E., Demangeat, G., Van Helden, M., & Esmenjaud, D. (2012). Control of *Xiphinema index* populations by fallow plants under greenhouse and field conditions. *Phytopathology*, *102*(6), 627-634.

Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Katiki, L. M., Costa-Júnior, L. M., Tamboura, H. H., ... & Louvandini, H. (2017). Comparison of the in vitro anthelmintic effects of Acacia nilotica and Acacia raddiana. *Parasite*, *24*.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES…)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques parues	
Publications scientifiques à paraître	Lise Negrel, Raymonde Baltenweck, Gérard Demangeat, Philippe Hugueney & Olivier Lemaire. Metabolomic analysis of three fabaceae and their potential use as bionematicide fallows against the nematode *Xiphinema index*, vectoring fanleaf disease to grapevine. Lise Negrel, Gérard Demangeat & Olivier Lemaire. Antagonistic effects of the nematoparasitic fungus *Catenaria anguillulae* on the soil-borne longidorid nematode *Xiphinema index* transmitting grapevine fanleaf virus to grapevine.
Publications scientifiques prévues	

COLLOQUES

Participations passées à des colloques	Lemaire O., Séminaire de lancement des projets Ecophyto 2, Académie d'Agriculture, Paris,16 oct 2015. Lemaire O., Invitation Union Champagne oct 2015 Avize publié dans le Vigneron Champenois ; 2016. Les avancées dans la lutte contre le court-noué. Le Vigneron Champenois, April 2016, 36-49. Negrel Lise, Marmonier Aurélie, Demangeat Gérard, Gertz Claude, Vigneron Sophie, Ley Lionel, Esmenjaud Daniel, Laveau Coralie, Hugueney Philippe, Baltenweck Raymonde, Marchal Axel, Fischer Marc, Bertsch Christophe and Lemaire Olivier, 2017. BIOCOU project: a bionematicide control strategy against Grapevine fanleaf degeneration. 16e Rencontres de Virologie Végétale, 15-19 janvier 2017, Proceedings, p. 96
Participations futures à des colloques	

THESES

Thèses passées	
Thèses en cours	

ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION

Articles de valorisation parus	Lemaire, O. et G. Uriel. 2016. Les avancées dans la lutte contre le court-noué. Le Vigneron Champenois, April 2016, 36-49
Articles de valorisation à paraître	
Articles de valorisation prévus	

AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS

Actions vers les médias (interviews…) effectuées	« Combiner les réponses contre le court-noué ». Revue Viti (08.12.2017) « *Des granulés de sainfoin contre le court-noué de la vigne* ». Revue Viti (03.01.2018) « *Voir la vigne en rose* ». Journal L'Est Eclair (26.06.2017) « *Le sainfoin, une plante à remettre au menu* ». Journal La France Agricole (15.06.17) « *Sainfoin, priez pour nos vignes* ». Journal La champagne viticole (06.01.2018)
Actions vers les médias prévues	
ENSEIGNEMENT - FORMATION	
Enseignements/formations dispensés	Violette Sornin juin 2017 ; rapport de DUT : contribution à la mise en évidence de l'activité nématicide d'espèces végétales afin de mettre au point une méthode de lutte contre le vecteur du court-noué de la Vigne
Enseignements/formations prévus	
EXPERTISES	
Expertises menées	Évaluation en conditions de laboratoire des propriétés nématicides des granulés de sainfoin vis-à-vis des nématodes vecteurs du court-noué de la Vigne, dans le cadre d'un partenariat avec MULTIFOLIA
Expertises en cours	
Expertises prévues	
METHODOLOGIES (GUIDES…)	
Méthodologies produites	-Mise au point du screening de molécules candidates bionématicides en conditions contrôlées vis-à-vis des nématodes ectoparasites, vecteurs de la maladie du court-noué. Intérêt des firmes de Biocontrôle pour évaluer l'effet bionématicide de leurs préparations naturelles -Etudes métabolomiques (LC-MS) des exsudats racinaires de Fabacées
Méthodologies en cours d'élaboration	-Etudes métabolomiques (LC-MS + GC-MS) de terres de culture du sainfoin
Méthodologies prévues	Evaluation de l'intérêt des chamignons nématoparasites identifiés pendant le projet Biocou, en tant qu'agents potentiels de biocontrôle
AUTRES	
Séminaire de la filière nationale du Sainfoin : *Journées Multifolia*	« *Le sainfoin ré-inventé* », 2 journées de séminaires organisées par la filière Sainfoin et Multifolia les 12 et 13 juin 2017. Présentation de 2 exposés, par Lise Negrel et Olivier Lemaire devant la filière et les professionnels sur nos avancées concernant les plantes nématicides et les premiers résultats obtenus dans le cadre des projets BIOCOU et Multifolia. Rencontre des productions animales et végétales.

RESUMES

En français

RESUME LONG
2 pages reprenant les rubriques de la synthèse – A mettre à jour par rapport à votre projet initial

Contexte
Objectifs
Méthodologie
Principaux résultats obtenus
Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles
Recommandations

La maladie du court-noué, maladie à virus de la vigne, est l'une des causes du dépérissement de la vigne. Cette maladie est présente dans la totalité du vignoble français. Elle se caractérise par un large spectre de symptômes qui varient d'une situation viticole à une autre, résultante d'une interaction complexe entre les virus, le nématode vecteur, la plante et l'environnement. En l'absence de résistances et d'itinéraires techniques efficaces, la lutte contre le court-noué combine actuellement l'utilisation de matériel végétal sain et la prévention des contaminations à la parcelle en diminuant le potentiel infectieux du sol par la dévitalisation avant arrachage, la désinfection et le repos du sol et l'utilisation de plantes de jachères.
Concernant cette dernière stratégie, des expérimentations en conditions contrôlées en serre et au vignoble ont montré que certaines plantes couvre-sol, notamment de la famille des *Fabacées*, avaient un effet antagoniste efficace vis-à-vis du nématode vecteur. Utilisées en jachère d'inter-culture, elles pourraient permettre de diminuer la durée du repos avant replantation de la nouvelle vigne et par conséquent de limiter les pertes économiques associées. Le sainfoin et le lotier font partie des espèces candidates à l'étude. Une autre voie de lutte alternative est l'incorporation dans le sol des produits d'origine biologique pouvant libérer des principes bio-nématicides dans la profondeur du sol. Les granulés de sainfoin, élaborés et fournis par notre partenaire Multifolia, apparaissent comme de bons candidats pour lutter contre les nématodes du sol, du fait de leurs propriétés nématicides déjà mises en évidence dans le tractus digestif chez les ruminants. Récemment, des premiers essais en laboratoire, conduits à l'INRA de Colmar, montrent que des extraits aqueux de granulés de sainfoin entrainent une mortalité importante de nématodes.

Les travaux proposés dans le cadre de la mission du CDD recruté, Lise Negrel, auront pour objectif d'étudier en partie le métabolome de 4 *Fabacées* (le lotier corniculé, le sainfoin, le trèfle violet et la luzerne) en Chromatographie Liquide à Haute performance associée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) et à la Chromatographie en Phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) et d'identifier des molécules candidates pour leurs propriétés biologiques nématicide. Le potentiel « bio-nématicide » de ces molécules sera évalué lors de bioessais en conditions contrôlées sur *Xiphinema index (X. index)*.
Des analyses en LC-MS et GC-MS pour étudier les modifications chimiques du sol avant et après culture de *Fabacées* pourront également être proposées, afin de déterminer la teneur

du sol en pyrazines et autres composés synthétisés par ces plantes, susceptibles d'inhiber les nématodes.

Etude du métabolome des *Fabacées* – identification des molécules à potentiel nématicide et mécanismes d'action :

Les premières analyses en LC-MS correspondant à l'étude en comparaison de trois *Fabacées* et du cépage Cabernet–Sauvignon ont permis de sélectionner 18 ions candidats, spécifiquement produits dans le sainfoin, le lotier et le trèfle violet, et appartenant principalement à la famille des flavonoïdes et des glucosinolates. Ces résultats devront être confirmés et complétés par des analyses GC-MS. La recherche de ces molécules candidates sera également effectuée chez la luzerne. L'ensemble des résultats sera comparé au métabolome chez la vigne.
Bien que faiblement détectées par la méthode d'analyse LC-MS mise en place par l'INRA de Colmar, les pyrazines représentent des candidats sérieux. En effet, la nature volatile de ces composés facilite leur diffusion dans la terre avoisinant les systèmes racinaires des *Fabacées*, et est responsable de l'odeur de petit-pois et de poivron qui se dégage du substrat de croissance de ces plantes. De plus ce sont des molécules qui semblent être produites de façon ubiquitaire dans les *Fabacées*, tandis qu'elles ne sont produites quasiment que dans les baies de la vigne. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse suivie de la spectrométrie de masse (GC-MS) devrait permettre de déterminer précisément la structure et la concentration de ces molécules dans les échantillons de sol de sainfoin.
Des analyses en LC-MS et GC-MS des modifications chimiques du sol avant et après culture de *Fabacées* sont ainsi proposées, afin de déterminer la teneur du sol en pyrazines et autres composés synthétisés par ces plantes. Les nématodes ne semblant pas se nourrir directement sur les racines de sainfoin, il est probable que les molécules nématicides soit directement exsudées dans le sol. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les exsudats racinaires de *Fabacées* présentent un effet antagoniste aux nématodes, mais la faible concentration en molécules dans ces échantillons complique l'identification des molécules nématicides.

D'autres molécules candidates à l'étude parmi les flavonoïdes, sont les tanins. En effet, d'après la littérature, les tanins condensés sont des composés à effet nématicide reconnu, que soit en nématologie animale ou végétale. Cependant, la vigne qui est l'hôte principal de *X. index*, est fortement productrice de tanins, et des monomères de tanins ont été identifiés dans des concentrations similaires dans les différents compartiments des *Fabacées* et de Cabernet Sauvignon. De plus, l'absence d'information sur la structure des tanins condensés produits par le sainfoin rend difficile leur identification et donc l'évaluation de leur potentiel nématicide. Dans une première approche, nous avons évalué l'effet antagoniste des monomères et de deux dimères de tanins commercialisés. Ces molécules n'ont provoqué aucune altération de la survie des nématodes. Il est possible que le potentiel nématicide du sainfoin résulte de la synergie des tanins avec d'autres molécules, tel que démontré dans les travaux de Ropiak *et al.*, (2016). Ces derniers ont également montré que les tanins condensés endommagent sérieusement la cuticule externe de *C. elegans*. Des observations identiques induites par des solutions de sainfoin chez *X. index* sont envisagées par *Cryo-Scanning Electron Microscopy* (Collaboration possible avec NANO IMAGING LAB, Bâle, Suisse).
Une extraction en laboratoire des tanins de sainfoin est ainsi à l'étude afin d'évaluer l'effet nématicide de ces molécules complexes sur *X. index*. Cependant, les tanins condensés sont

des molécules très hydrophobes, et leur évaluation nécessitera la mise en place d'un protocole spécifique de bioessais. L'activité nématicide de molécules produites spécifiquement chez les trois *Fabacées* étudiées, comme la formononetine est prévue dans ce projet. Ces molécules étant également hydrophobe, leur activité sera analysée concomitamment aux tanins condensés.
Les perspectives de cet axe concernant l'identification de molécules bio-nématicides vis-à-vis de *X. index*, agissant seules ou en synergie permettront d'envisager à moyen terme avec notre collaborateur sélectionneur Jouffray-Drillaud, une sélection des espèces, écotypes… de *Fabacées* basée sur le dosage des molécules d'intérêt. Ces composés bionématicides actifs pourront aussi être recherchés et dosés chez les *Fabacées* spontanées se développant dans et autour des parcelles viticoles.

Les effets sur la transmission du virus :

Nous évaluerons en conditions contrôlées (en serre), l'influence des espèces végétales « nématicides » sur la transmissibilité du GFLV. En effet, outre l'effet réducteur des populations de nématodes, ces espèces végétales, non-hôtes du virus pourraient avoir un effet sur la diminution également des populations de nématodes hébergeant le virus (perte de viruliférité des nématodes), étant donné que le virus est perdu à chaque mue du nématode. Dans le même ordre d'idée, il sera intéressant de vérifier si un nématode au contact d'une de ces plantes nématicides, entière ou déshydratée (granulés) ou encore ayant été préalablement traité avec de plus faibles doses de molécules antagonistes identifiées dans le volet précédent, verra sa capacité vectrice altérée. Des tests de transmission en conditions contrôlées (serres et pièces climatisées), bien maîtrisés par l'INRA de Colmar, permettront de répondre à ces questions.

En conclusion, ces travaux de recherche effectués sur le métabolome des *Fabacées* apporteront une meilleure connaissance de leurs propriétés antagonistes vis-à-vis des nématodes du sol. Nous pourrons en particulier mettre en relation ces propriétés biologiques avec la présence de certains composés de la plante tels que les tanins condensés et autres flavonoïdes, ou les saponines ou d'autres molécules et leurs éventuelles synergies.
Ces résultats consolideront également la filière « sainfoin » naissante en France et portée par Multifolia, en définissant un cahier des charges de production (choix des espèces de *Fabacées*, impact des saisons sur la production des molécules nématicides …), et en créant de la valeur ajoutée sur le territoire grâce à la mise sur le marché de granulés déshydratés de sainfoin ou autres légumineuses utilisables potentiellement au vignoble.
L'identification de traceurs métaboliques permettra d'une part de contribuer à l'amélioration génétique de ces *Fabacées* à effet nématicide en partenariat avec le semencier partenaire, et d'autre part de contrôler la qualité des plantes couvre-sol et des granulés et de réaliser des fiches « produit » pour les marchés ciblés. Ce projet devra permettre à la filière sainfoin française de se positionner sur un marché en émergence, celui du biocontrôle végétal.
Les objectifs finalisés de cette étude seront de proposer aux viticulteurs un mode d'emploi efficace des granulés de sainfoin et plus généralement des *Fabacées*, en inter-culture, voire en inter-rang, contre la propagation de la maladie et la restauration des sols viticoles fortement contaminés pour la replantation de jeunes vignes.

A plus long terme, il est prévu l'intégration de cette stratégie dans une approche globale de gestion intégrée et durable de la maladie exploitant des stratégies complémentaires de lutte, soit contre le virus soit contre le nématode.

MOTS-CLÉS

Court-noué, viroses de la Vigne, dépérissement, analyse métabolomique, LC-MS, nématodes, *Xiphinema index*, bioessais, sainfoin, Fabacées, *Rhizobium*

RAPPORT SCIENTIFIQUE

BIOCOU

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA MALADIE DU COURT NOUE DE LA VIGNE : IMPACT DE L'INTEGRATION DE TECHNIQUES CULTURALES IMPLIQUANT DES JACHERES EN INTER-CULTURE ET L'UTILISATION D'UN PORTE-GREFFE RESISTANT, SUR LES POPULATIONS DE NEMATODES ; COMPREHENSION DU MODE D'ACTION DES PLANTES COUVRE-SOL A EFFET NEMATICIDE

ECOPHYTO APR 2014 ONEMA « Résistance et Pesticides » axe 3

Coordinateur du projet : Olivier Lemaire, INRA Colmar

Ingénieure de Recherche en CDD sur Biocou : Lise Negrel, INRA Colmar

Autres partenaires scientifiques bénéficiaires : Christophe Bertsch, Université de Haute-Alsace, Colmar

Rapport scientifique du projet BIOCOU

Lise NEGREL[1], Sophie VIGNERON[1], Marc FISCHER[2] et Olivier LEMAIRE[1] ;
[1]INRA Colmar, UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin
[2]Université de Haute Alsace, Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement (LVBE)

Contexte et enjeux

Le court-noué est une maladie virale de la Vigne due principalement au GFLV (grapevine fanleaf virus), et entraînant un dépérissement du vignoble. Cette virose est inscrite depuis 2017 au Plan National du Dépérissement du Vignoble (PNDV). Elle est transmise par des nématodes du sol (*Xiphinema index* et *Xiphinema diversicaudatum*) qui piquent les racines des vignes pour s'alimenter et transmettent ainsi le virus s'ils sont eux-mêmes virulifères (porteurs du virus), ou bien l'acquièrent si la vigne est préalablement virosée. On appelle ainsi « potentiel infectieux » du court-noué, le pathosystème constitué du virus pathogène et de son nématode vecteur. Les nématodes se développent en suivant la croissance racinaire et peuvent vivre à de grandes profondeurs (jusqu'à 10 m de profondeur). Après arrachage de la vigne, ces nématodes ectoparasites sont capables de rester à l'état quiescent pendant 4 à 5 ans dans le sol, en absence de toute culture.

Avec l'évolution de la réglementation sur l'utilisation des produits phytosanitaires, la plupart des nématicides de synthèse et désinfectants de sol ont été interdits d'utilisation dans l'UE depuis 2009. Les seuls moyens actuellement disponibles pour lutter contre cette maladie sont, dans les parcelles sans court-noué, la prophylaxie par sélection et plantation de plants certifiés indemnes des virus du court-noué et, dans les vignobles infectés, la dévitalisation puis l'arrachage des ceps virosés, suivis de la mise au repos de la parcelle (jachère en inter-culture). Ces itinéraires techniques permettent de diminuer le potentiel infectieux du sol dû aux nématodes virulifères.

Des pistes alternatives sont à l'étude à l'INRA de Colmar depuis une dizaine d'années, et visent à combiner différents leviers d'action pour lutter contre la maladie du court-noué, avec en particulier l'utilisation de plantes à effet nématicide. Cette stratégie pourrait permettre d'économiser de 6 à 8 ans par rapport aux préconisations de jachère actuelles, en réduisant très efficacement le potentiel infectieux du sol sur un pas de temps d'environ 1 à 3 années, économiquement compatible avec les enjeux socio-économiques viticoles. La recherche de

moyen de lutte contre le court-noué se focalise actuellement sur la recherche de cépages résistants (au virus par voie génétique et biotechnologique), l'utilisation de porte-greffes résistants (au nématode par voie génétique) et l'utilisation des plantes à effet nématicide. Une résistance au nématode vecteur identifiée chez la variété muscadine (*Muscadinia rotundifolia*) a été introgressée en partie chez le porte-greffe 'Nemadex Alain Bouquet' (Bouquet *et al*., 2000). Cette accession réduit très fortement la multiplication des nématodes et retarde la contamination des nouvelles plantations (Esmenjaud et Bouquet, 2009). Cependant, des études à l'échelle du vignoble français montrent les limites de ce matériel et soulignent la nécessité de l'associer à d'autres voies de contrôle du nématode vecteur. (Esmenjaud *et al*., 2010, Claverie 2016).

Une autre stratégie qui vise à contrôler les populations de nématodes est le recours à des plantes à actions antagonistes comme alternative à l'utilisation de nématicides de synthèse. Les travaux de Laure Villate (2013) ont consisté à suivre l'évolution de population de *X. index* en présence de différentes plantes couvre-sol. Ainsi, des expérimentations en conditions contrôlées en serre et au vignoble ont montré que certaines plantes couvre-sol, notamment de la famille des Fabacées, avaient un effet antagoniste efficace vis-à-vis de *X. index*, le principal nématode vecteur du virus du court-noué (Villate 2013). Utilisées en jachère d'inter-culture, elles pourraient permettre de diminuer la durée de mise au repos avant replantation de la nouvelle vigne et par conséquent de limiter les pertes économiques associées. Le sainfoin et le lotier font partie des espèces candidates à l'étude. En 2009, une démarche d'évaluation de l'efficacité de jachères « nématicides » utilisées en complément du repos du sol a été initiée dans le cadre d'un projet FAM pluri-annuel. Après une première étape ayant démontré la capacité de certaines plantes à réduire les populations de vecteurs, une seconde étape a été mise en place pour vérifier si ces baisses d'effectifs de vecteur se traduisent effectivement par un retard à la contamination par le virus. Un réseau de 13 parcelles en sol fortement contaminé a été développé dans la plupart des vignobles français entre 2009 et 2015 afin de comparer diverses plantes conduites pendant deux années de jachère à un témoin sol nu. Les plantes ont été semées en bandes d'au moins 30 mètres de long par 10 mètres de large et avec des répétitions (généralement 3 à 4). Après deux ou trois années de cycles de plantes bionématicides candidates, dont le développement a été suivi, la vigne fille a été plantée sur le tracé des anciennes modalités. Chaque essai a fait l'objet de tests ELISA dès l'année de la plantation (T0) au mois de mai-juin. En 2017, toutes les parcelles étaient replantées, les plus anciennes étant en 5è feuille. Des re-contaminations par le virus étaient déjà visibles dans toutes les parcelles au moins en 2eme feuille. Plusieurs parcelles étaient en pleine « explosion » en termes de re-contaminations : Chateauneuf CA84, Bernardwiller, Meursault, Volnay… Ainsi cette étude de terrain à grande échelle montre une réduction du potentiel infectieux du sol des parcelles. Cependant, et durant cette durée de jachère de 2 ou 3 années, la réduction des populations de nématodes virulifères n'est pas suffisante pour empêcher la transmission du virus du court-noué à la jeune vigne. La conclusion principale de ce réseau national d'essai indique la nécessité de combiner plusieurs stratégies pour aboutir à la gestion intégrée de cette maladie de dépérissement du vignoble.

Ainsi, lors des 24 mois du projet Biocou, en 2016 et 2017, nous avons poursuivi les analyses sur l'un de nos sites expérimentaux (St Pierre, 67), combinant une jachère et le porte-greffe Nemadex AB résistant au nématode *X. index.* Une expérimentation intégrant l'épandage de granulés de sainfoin a été commencée en 2017 en vignoble alsacien (Bergheim, 68) en complément d'une jachère avec de la luzerne.

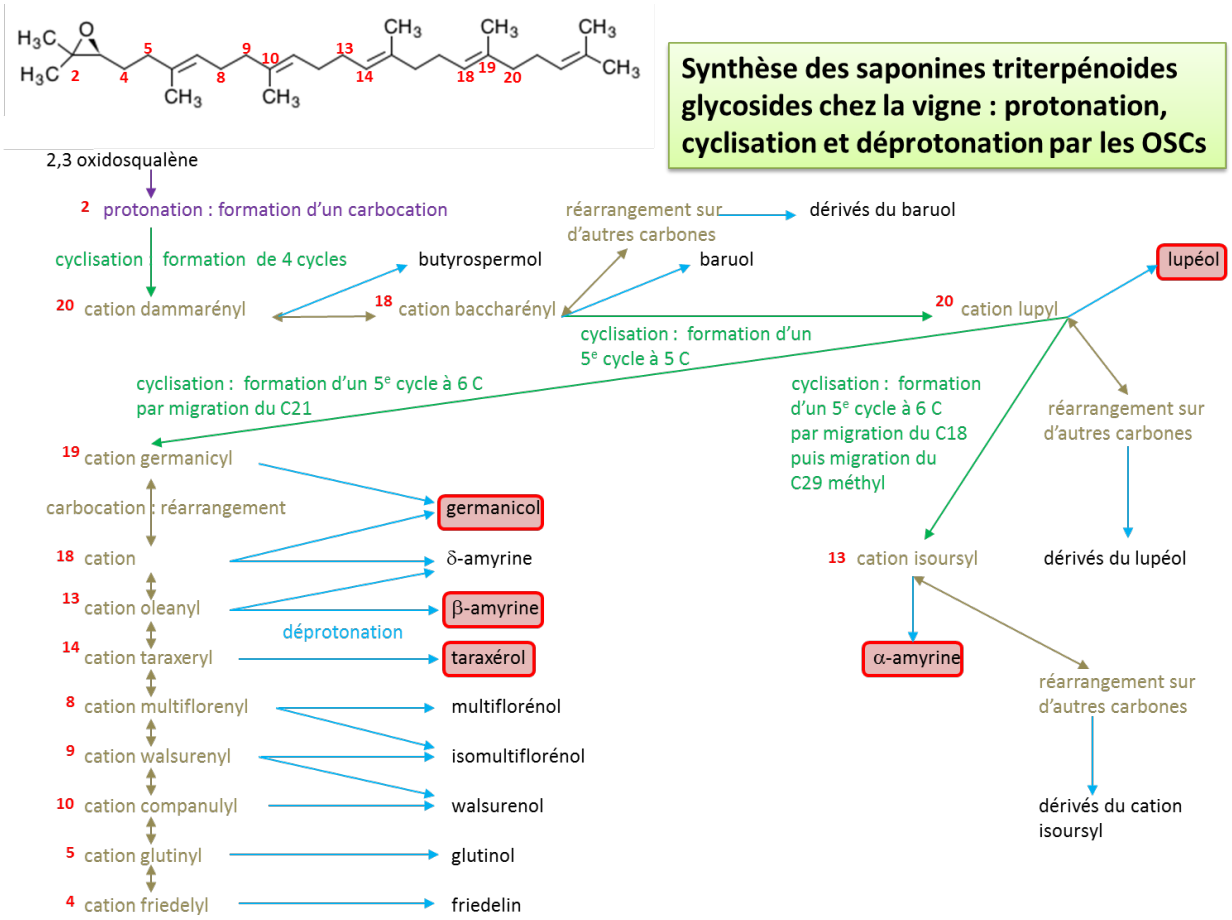
En effet, une autre voie de lutte alternative est l'incorporation dans le sol des produits d'origine biologique pouvant libérer des principes « bio-nématicides » dans les différents horizons du sol (on peut en effet retrouver le nématode vecteur à plus de 1 m de profondeur). Les granulés de sainfoin commercialisés par MULTIFOLIA (entreprise française, basée à Viâpres-le-Petit, et qui cultive et déshydrate le sainfoin), apparaissent comme de bons candidats pour lutter contre les nématodes du sol, du fait de leurs propriétés nématicides déjà mises en évidence dans le tractus digestif chez les ruminants. De nombreux résultats ont été publiés et diffusés à travers les projets « *HealthyHay* » et « *LegumePlus* » (consultation des résultats de ces projets sur le site www.sainfoin.eu) sur les propriétés antihelminthiques du sainfoin (Hoste *et al.*,2015 ; Klongsiriwet *et al.,* 2015 et Quijada et *al.*, 2015). Les données issues de la thèse co-financée par MULTIFOLIA sur la caractérisation des granulés de sainfoin comme alicament en santé animale sont en cours de publication ou déjà publiés (Gaudin *et al.*, 2016). Une autre publication récente a été faite sur les propriétés antiparasitaires des granulés de sainfoin, résultats obtenus d'après les granulés fournis par MULTIFOLIA (Desrues *et al.*, 2016). L'effet anthelminthique du sainfoin contre *Ostertagia ostertagi* et *Cooperia oncophora* est attribué au contenu de ses parties aériennes en tanins condensés (Paolini *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une activité anthelminthique induite par une relation synergique entre des tanins condensés et un ou des métabolites secondaires émerge depuis quelques années. Cependant, si l'inhibition de l'activité anthelminthique des tanins est aisément obtenue en laboratoire par ajout de PVPP (qui précipite les tanins), l'identification de ces métabolites est complexe. Ainsi lors de l'étude comparative du potentiel nématicide des feuilles d'*Acaccia raddiana* et *d'Acaccia nilotica* Zabre *et al*., (2017) ont démontré que l'inhibition des tanins ne supprime pas entièrement le potentiel anthelmintique d'*Acaccia raddiana* contre *Haemonchus contortu*s, sans proposer l'identité de la molécule impliquée. Barrau *et al*., (2005) ont pu démontrer en analysant des extraits de sainfoin que son potentiel anthelminthique contre *Haemonchus contortus* été induit par les tanins condensés, mais également des flavanols glycosides, sans toutefois réussir à les identifier. Certaines molécules reconnues pour leur potentiel anthelmintique semble également améliorer l'activité antagoniste des tanins condensés. Il s'agit notamment de la lutéoline, la quercétine, la naringenine, la cinnamaldéhyde, la myricétine et le kaempferol (Klongsiriwet *et al*., 2015 ; Ropiak *et al*., 2016 ; Mengistu *et al*., 2017). En utilisant le même procédé dans l'objectif d'évaluer le potentiel nématicide de l'acacia et du sainfoin sur différents isolats d'*Haemonchus contortus*, Chan-Pérez *et al*., (2016) ont mise en lumière la complexité d'action de ces plantes, et la difficulté de les étudier . En effet, d'après leurs résultats le potentiel antagoniste de ces plantes apparaît « isolat-dépendant». Par exemple, les extraits de sainfoin ont montré un effet

ovicide indépendamment de l'ajout de PVPP sur les isolats CENID, CAVR, FESC. Cependant, dans les mêmes conditions (extrait de sainfoin + PVPP) l'effet ovicide est renforcé sur l'isolat WHITE-RIVER. Dans le cas de l'isolat INRA d'*Haemonchus contortus*, l'ajout de PVPP réduit le potentiel ovicide du sainfoin.

Les molécules associées à ce potentiel effet nématicide des Fabacées ne sont pas encore identifiées, même si des hypothèses sur les composés impliqués ont été proposées. Ainsi les travaux de quijada *et al.*, (2013), ont montré que des extraits de plantes contenant des saponines avaient un effet nématicide vis-à-vis des nématodes vecteurs des virus du court-noué (GFLV et ArMV). En ce qui concerne la Vigne (*V. vinifera*), les saponines racinaires présentent une absence d'efficacité vis-à-vis des nématodes. Cette non-efficacité des saponines de la vigne constitue un handicap pour cette plante qui ne peut contrôler à elle seule les populations de nématodes présentes dans les sols. Il semble cependant exister un potentiel d'amélioration des niveaux de résistance de la vigne, en se basant sur l'utilisation de ressources génétiques présentes dans d'autres espèces de vigne. Le porte greffe Nemadex AB (Esmenjaud et Bouquet 2009), variété issue d'un croisement entre un hybride F1 (VMH 8771) de *Vitis vinifera* (Cabernet-Sauvignon x Alicante Henri Bouschet) et de *Muscadinia rotundifolia* (NC 184-4), et le 140 Ruggeri, présente une résistance accrue au phylloxéra et une résistance partielle aux nématodes permettant, au vignoble, de retarder l'infection et de ralentir les contaminations par le virus du court noué. Le Némadex AB présente deux inconvénients majeurs : faible vigueur et sensibilité à la chlorose et à la sècheresse.

A ce stade des connaissances, il est important d'identifier les différentes sources de résistance (et de sensibilité) existant chez la vigne pour savoir s'il est possible de disposer à terme d'un porte-greffe dont la résistance pourrait être apportée par un profil en saponines différent. Nous avons débuté ce volet en étudiant la diversité des saponines naturellement synthétisées par la vigne *V. vinifera* PN40024.

La cyclisation du 2,3 oxidosqualène génère un carbocation protostéryl ou un carbocation dammarényl utilisés par des voies biochimiques différentes. Le carbocation dammarényl génère l'acide oléanolique et les intermédiaires détectés chez la vigne et produisant les saponines triterpénoïdes (voir schéma de biosynthèse ci-dessous).



Voie de formation par les OSCs des différents composés rencontrés chez la vigne

Le PN40024, organisme référence de la vigne pour le séquençage, a été utilisé pour avoir des informations sur la fonction des OSCs potentiellement impliquées dans la synthèse des saponines. L'approche par clonage Gateway a été privilégiée en raison de sa flexibilité pour le sous clonage. Dans un premier temps, les gènes ont été sous clonés dans le vecteur pDONR207 chez la bactérie Escherichia coli chez laquelle la sélection par la gentamycine est possible. A ce stade il a été possible de sous cloner 8 des 9 gènes dans le pDONR207, le clonage du gène VvTTPS3 se révélant par contre létal pour la bactérie. Une stratégie d'insertion d'un intron a alors été retenue, en se basant sur l'analyse de l'effet des introns sur l'expression effectuée par Yofe *et al.*, (2014) et l'intron de 115nt du gène YJL001W a été sélectionné pour être introduit dans la partie 5' de VvTTPS3 à une position compatible avec les bordures généralement observées en 5' et en 3' des introns de la levure (Ma et Xia, 2011). Le phénotype létal est cependant toujours présent malgré l'insertion de l'intron dans la séquence de VvTTPS3. Il arrive occasionnellement qu'un tel type de problème se rencontre et il est supposé qu'une expression non prévue de cet ADN génère un produit toxique pour la cellule bactérienne. Ce dernier gène est pour l'instant disponible sous la forme d'une orientation réverse en attendant une solution technique éventuelle. Les pistes envisagées pour résoudre cette difficulté consistent à augmenter la qualité des mécanismes de contrôle de l'expression (en cultivant la bactérie à plus faible température), à diminuer le nombre de copies du vecteur

(en choisissant un vecteur à faible nombre de copies ou une souche de bactérie comme les souches ABLE C and ABLE K d'Agilent n'autorisant qu'un faible nombre de copies plasmidiques).

L'expression pourra se faire chez la levure très prochainement. Cette expression sera réalisée dans une souche spécifique, GIL77, déficiente en lanostérol synthase (erg7 ura3-167 hem3-6 gal2) disponible au laboratoire et qui permet d'orienter le flux métabolique pour une expression optimisée de l'OSCs (Kushiro *et al*., 1998). Il n'est cependant théoriquement pas nécessaire de disposer d'une souche de levure mutée dans la voie des stérols pour favoriser l'expression des OSCs, la présence d'un promoteur inductible fort comme ADH1 ayant démontré son potentiel pour la caractérisation fonctionnelle de ce type de gènes (Fukushima e*t al*., 2014).

Concernant l'alimentation animale, l'effet anthelminthique du sainfoin contre *Ostertagia ostertagi* et *Cooperia oncophora* est attribué au contenu de ses parties aériennes en tanins condensés (Paolini et *al.*, 2003). Enfin, Ropiak et *al.*, (2016) a démontré que le potentiel antagoniste des tanins condensés contre *Caenorhabditis elegans* est exacerbé en présence de cinnamaldéhyde.

Les travaux de recherche effectués sur le métabolome du sainfoin, en étroite interaction avec l'activité biologique de molécules candidates spécifiques des Fabacées sur *X. index*, représentent ainsi un enjeu essentiel, notamment pour comprendre le mécanisme d'action bio-nématicide de cette Fabacée. Ce projet vise également à consolider une filière naissante en France, dont majoritairement en Région Grand-Est, en créant de la valeur ajoutée sur le territoire grâce à la mise sur le marché de granulés déshydratés de sainfoin ou autres légumineuses à tanins condensés et molécules bio-nématicides à caractériser.

Enfin, sur le plan expérimental, et de livrables opérationnels auprès de la filière viti-vinicole, des expérimentations de terrains ont été proposées dans le cadre de Biocou selon deux modalités : la première est basée sur un réseau de parcelles expérimentales pré-existantes – réseau initié en 2009 lors de projets financés par FranceAgriMer et coordonnés par l'IFV (Marion Claverie). Les cinétiques de re-contamination par le virus du court-noué de parcelles hébergeant des dispositifs complémentaires et présentes dans le vignoble alsacien sont poursuivies.

La deuxième modalité, et en partenariat avec la société Multifolia, a consisté à la mise en place de nouveaux essais, intégrant parmi d'autres paramètres d'étude, l'adjonction de granulés de sainfoin, avant replantation. L'ensemble de ces expérimentations en vignoble, avec l'acquisition de connaissances plus fondamentales sur le mode d'action des espèces végétales à activité antagoniste sur les nématodes, devraient nous permettre d'identifier des itinéraires techniques innovants. En association avec les autres thématiques sur le court-noué, nous pourrons initier des essais systèmes pour valider des stratégies intégrées de gestion durable

du court-noué et de répondre directement à la problématique du dépérissement dû au court-noué. Ces essais systèmes seront proposés et coordonnés avec le projet Vaccivine du PNDV (2018-2021), pour y introduire la composante du biocontrôle anti-viral par prémunition.

Matériel et Méthodes

Matériel

1. Elutriation de terre d'élevage de *Xiphinema index*

L'élutriation est un procédé permettant de séparer du sol et de concentrer les nématodes dans une solution aqueuse. L'élutriation se déroule en trois étapes (cf.fig.1). De la terre d'élevage de *X. index* est déposée sur un tamis de 2 mm placé dans un seau de 10 litres. Le sol est tamisé sous un filet d'eau, qui entraine les nématodes et les petits débris dans le seau. La solution récoltée dans le seau est ensuite agitée, puis filtrée après quelques secondes de repos sur un tamis de 80 µm. Ce court temps de repos permet aux débris de retomber au fond du seau, tandis que les nématodes en suspension, sont retenus sur le tamis. La surface du tamis est lavée à l'eau au dessus d'un bécher, ce qui permet de récolter les nématodes piégés dans le tamis. Au cours de cette étape, la population de nématodes est concentrée. Le contenu du bécher est ensuite passé à travers le tamis de 250 µm sous lequel est créé des remous. Les remous retiennent les nématodes sur le tamis tandis que les particules fines (comme les grains de sable) passent à travers. Les nématodes sont alors récoltés dans un bécher en lavant la surface du tamis.

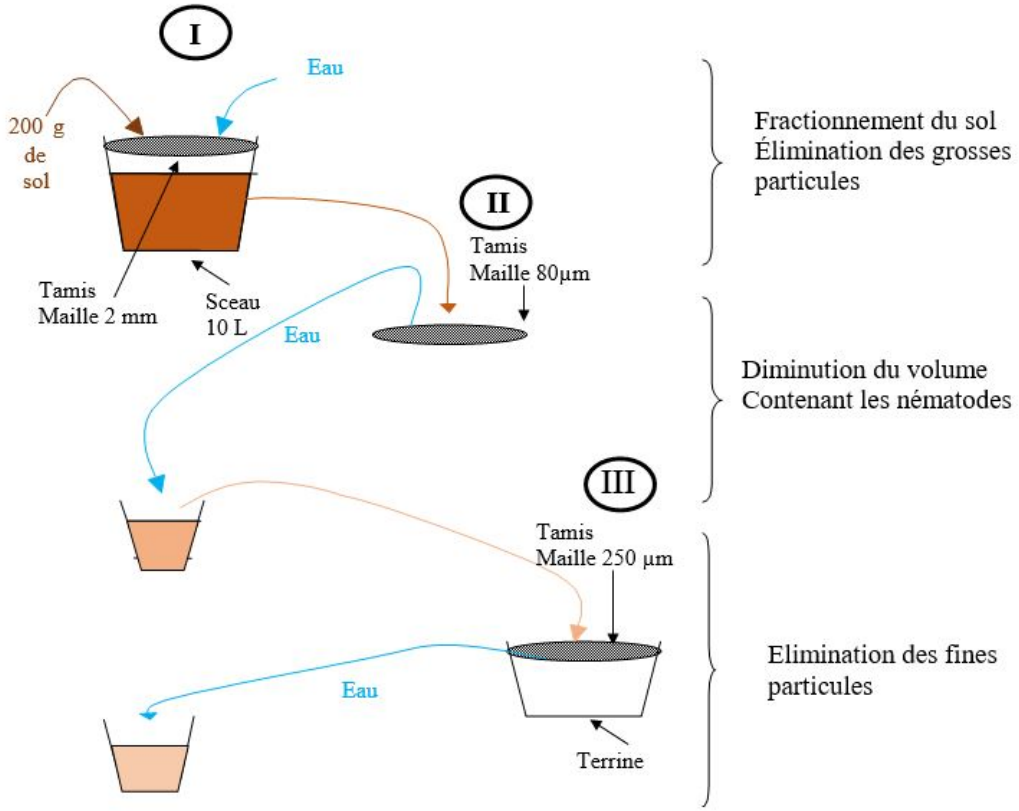


Fig.1 : <u>Schéma de la méthode d'élutriation des nématodes *X. index.*</u>

2. Méthode de culture des fabacées

Les fabacées sont cultivées en serre en conditions contrôlées (à 25.7°C et 62% d'hygrométrie) contenant 60% de sable et 40% de terre de Champagne, préalablement homogénéisés. La terre de Champagne a été préférée à un terreau classique en raison de sa richesse en rhizobia. Un apport d'engrais bleu universel concentré à 60 g/m2 est réalisé lors du semis. La terre est ensuite arrosée quotidiennement sans ajout d'engrais. Les fabacées sont récoltées après 3 mois de culture.

3. Exsudation de racines de fabacées

L'exsudation permet d'extraire dans de l'eau ultrapure des métabolites primaires et secondaires sécrétés par le système racinaire. Les plants de sainfoin sont dépotés et les racines sont délicatement lavées à l'eau. Les racines sont ensuite placées dans un récipient en verre contenant de l'eau du robinet pendant 30 minutes. Les plantes sont ensuite placées dans des flacons contenant de l'eau ultrapure. Les racines doivent être totalement immergées et protégées de la lumière. 2h30 plus tard la solution obtenue est récupérée.

Méthodes

1. Extraction des parties aériennes et des racines de fabacées et de vigne

L'extraction méthanol-chloroforme apporte une vue d'ensemble du métabolome du sainfoin. Le méthanol permet d'extraire et d'identifier les métabolites secondaires polaires et le chloroforme les molécules hydrophobes. Les échantillons sont lyophilisés et des prélèvements de 20 mg sont récupérés. Après broyage des prélèvements à l'aide d'un broyeur à billes, les métabolites sont extraits au méthanol/chloroforme (1/1, v/v) avec un volume de 15 µL par mg de poids sec. La suspension de poudre est ensuite traitée aux ultrasons pendant 15 minutes dans un bain d'ultrasons (50-60 Hz). 600 µL d'eau ultrapure sont rajoutés pour permettre la séparation des phases (cf. Fig.2). Après centrifugation à 15 000 g pendant 10 min, 100 µL de la phase méthanol sont récupérés pour analyse en LC-MS. 100 µL de la phase chloroforme sont récupérés puis dilués dans 100 µL de méthanol avant injection en LC-MS. Les résultats obtenus en LCMS sont analysés selon 2 approches : l'analyse non ciblée et l'analyse ciblée.

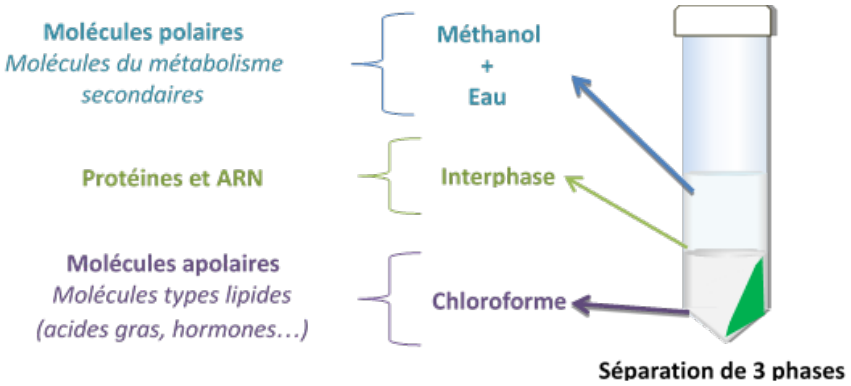


Fig.2 : Séparation des phases lors des extractions méthanol/chloroforme.

2. Extraction en phase solide des exsudats de fabacées

L'extraction en phase solide (solide-phase extraction, ou SPE) est une méthode de préparation de l'échantillon au cours de laquelle des composés en solution ou en suspension dans une phase liquide sont séparés des autres éléments du mélange par adsorption sélective sur une phase solide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Cette méthode a été utilisée afin de concentrer les exsudats avant analyse par LC-MS. L'activation de la colonne est effectuée par passage de 10 mL d'éthanol absolu. La colonne est ensuite nettoyée à l'aide de 10 mL d'eau ultrapure. 10 mL de l'exsudat à traiter est introduit dans la colonne. 10 mL d'eau ultrapure sont ensuite passés sur la colonne afin d'éliminer les impuretés possédant moins d'interactions avec l'adsorbant. Enfin, l'élution de l'exsudat s'effectue par passage successif de 2 mL d'éthanol à 10%, d'éthanol à 50%, d'éthanol absolu, et d'éthanol/chloroforme (1/1; v/v). Chacune de ces élutions sont récupérées et placées à

-20°C en attendant les analyses.

3. Analyse LC-MS

Les analyses ont été réalisées sur un système de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) Dionex Ultimate 3000, équipé d'une colonne Nucleodur C18 HTec (Macherey-Nagel, 150 mm x 2 mm diamètre interne, particules de 1,8 µm de diamètre) maintenue à 30 °C. Les éluants utilisés sont les suivants : eau / acide formique (0,1 %, v/v ; éluant A) et acétonitrile / acide formique (0,1 %, v/v; éluant B) ; le débit est maintenu à 0,25 mL / minute. Le programme de séparation utilisé est le suivant : 80% d'éluant A dans les conditions initiales, 80% à 70% d'éluant A en 4 minutes, 70% à 50% d'éluant A en 1 minute, 1.5 minutes en isocratique à 50% d'éluant A, 50% à 1% d'éluant A en 2 minutes et enfin isocratique avec 1% d'éluant A pendant 1.5 minutes. Le volume d'échantillon injecté est de 1µl.

Le système chromatographique est couplé à un spectromètre de masse haute résolution Exactive (Thermo Fischer Scientific, San Jose, USA) équipé d'une source à ionisation électrospray opérant en mode positif ou négatif. Les paramètres du spectromètre sont fixés à 300°C pour la température du capillaire de transfert des ions et 2500 V pour le voltage de l'aiguille de nébulisation. Les débits d'azote du gaz de nébulisation (sheath gas) et du gaz auxiliaire (auxiliary gas) sont maintenus à 50 et 5 (en unités arbitraires) respectivement. Les spectres sont enregistrés sur la gamme de masse m/z entre 100 to 1200 unité de masse atomique (u.m.a.), en utilisant une résolution de 50 000 à m/z 200 u.m.a. Le système est calibré dans la gamme m/z 100-2000 u.m.a. en utilisant les calibrants Thermo Fisher, donnant une précision en masse inférieure à 2 ppm. Les instruments sont controlés par le logiciel Xcalibur et les données sont traités par les logiciels Xcalibur (analyses ciblée) et XCMS (analyse non ciblée).

Le spectromètre de masse Exactive (Thermo Fischer) possède un analyseur de masse OrbitrapTM permettant une analyse qualitative et quantitative de tous les métabolites présents dans un échantillon complexe (méthode « full scan »), de masses comprises entre 100 et 1 200 m/z dans notre cas, avec une excellente sensibilité, et une très haute résolution. Les métabolites provenant de l'UHPLC ou injectés directement dans le spectromètre de masse par infusion, sont ionisés par une source d'ionisation électrospray (ESI : electrospray ionisation source). La cellule C-Trap permet de rediriger le flux d'ions soit vers la cellule HCD qui permet de fragmenter les ions (utilisation pour la détermination de structure), soit vers la cellule OrbitrapTM. La cellule OrbitrapTM est une électrode creuse à l'intérieur de laquelle est placée une électrode en fuseau, cette cellule permet de piéger les ions par une force électrostatique. Les ions qui pénètrent dans la cellule OrbitrapTM entament un mouvement oscillato-rotatoire autour de l'électrode. Ce mouvement est détecté et analysée par la cellule OrbitrapTM et permet une mesure de m/z très précise (de 1 à 2 ppm) et une excellente résolution (env. 100 000). Ce spectromètre permet également de réaliser des cycles avec différentes polarités (changement de polarité réalisé en moins d'une seconde), ce qui permet par exemple de

quantifier au cours d'une même analyse le resvératrol (mode négatif) et le ptérostilbène (mode positif).

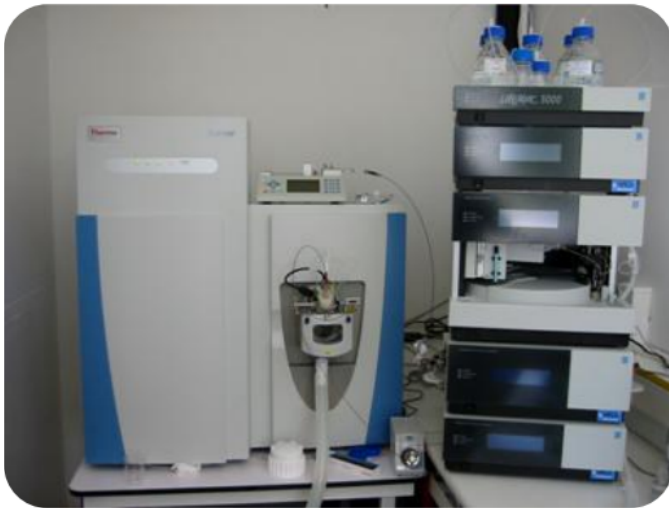


Fig.3 : Chaîne de chromatographie liquide UHPLC Dionex Ultimate 3000 (à droite sur la photo) couplée au spectromètre de masse Thermo Exactive (à gauche sur la photo).

4. Analyse des données LC-MS.

Les données LC-MS analysées en ciblé ont été traitées par le logiciel Xcalibur (processing setup, QuanBrowser). Un fichier excel est généré à la suite du réalignement des pics. Un test de Student a ensuite permis de sélectionner les molécules présentant une différence significative entre les conditions étudiées (p-value <0,05). Pour l'analyse non ciblée, les données LC-MS ont été traitées par le package Xcms sur le logiciel R (cf. Fig.4). Le package Xcms permet l'identification des pics (argument xcmsSet()), qui sont ensuite recherchés dans les autres groupes d'échantillons étudiés (argument group()). En parallèle, les temps de rétention observés entre les groupes sont réalignés (retcor()). Les pics manquants sont identifiés par l'argument fillpeak(). Une analyse statistique des données obtenues est effectuée sur un groupe d'échantillons pré-définis. Un fichier de données excel est généré par R.

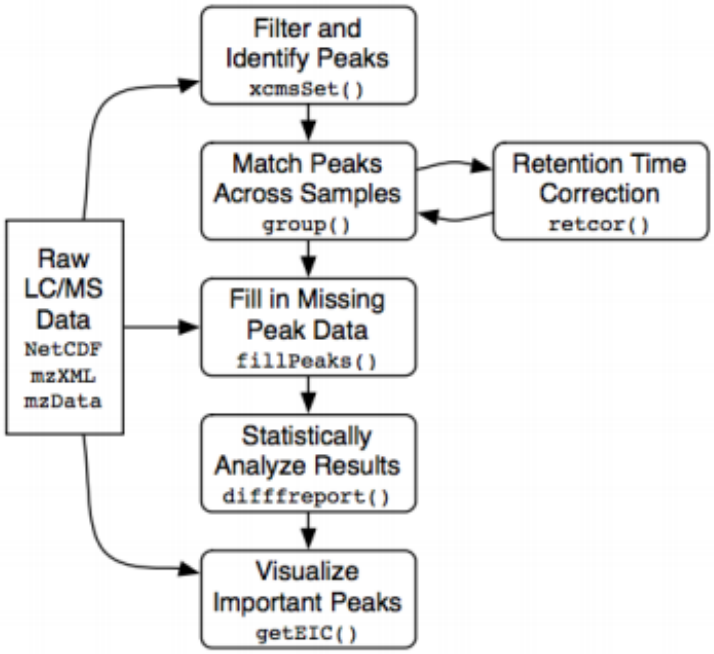


Fig.4 : Diagramme simplifiant le pré-traitement effectué par Xcms.

5. Bioessais sur nématodes

A. Bioessais aqueux

L'objectif des bio-essais est d'évaluer le caractère nématicide d'une ou plusieurs substances. Les bio-essais aqueux sont effectués dans des boites 6 puits contenant 2 mL de solution à tester. Les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau Volvic, afin de conserver la même composition minérale, et 1% de PBS. Certaines molécules faiblement hydrosolubles ont nécessité l'ajout de 5% de DMSO. Les bioessais sont effectués sur 50 *X. index*, préalablement élutriés. Tout les bioessais aqueux ont été répétés 4 fois. Le pH des solutions testées doit être situé entre 7 et 9, en raison de la sensibilité des nématodes au pH acides. Les bioessais sont conservés dans le noir et à 18°C. La survie des nématodes est suivie sous loupe binoculaire.

B. Bioessais sol

Les bioessais sol ont été effectués sur 100 g de terre d'élevage (contenant 300 nématodes pour 100 g de terre en moyenne). La terre est placée avec la solution aqueuse ou les poudres à tester dans des boites de pétri préalablement percées. Les bioessais sont conservés dans le noir et à 18°C. Après 3 ou 5 jours, les bioessais sont élutriés comme décrit précédemment. L'élutriation obtenue est ensuite laissée durant une nuit sur un tamis de 80 µm posé dans un récipient. Les nématodes vivants passent le tamis, tandis que les nématodes morts restent au-dessus du tamis. Le lendemain la solution tamisée est récupérée et les nématodes comptés sous loupe binoculaire.

6. Essais au vignoble

A. Essai de St Pierre

L'essai combinant jachère à effet bionématicide avec une des espèces candidates (la luzerne) et un porte-greffe résistant au nématode, le Nemadex AB, a démarré dans le vignoble alsacien (St Pierre - 67) en 2012. Après 2 années de jachères (avec des blocs contrôles en sol nu), cette parcelle a été implantée en juin 2014 par 2 modalités - 2 blocs avec Nemadex et 2 blocs avec porte-greffe (SO4) sans résistance au nématode. Le cépage Sylvaner a été greffé sur ces 2 porte-greffes. Chaque année des tests ELISA sont réalisés au mois de juin. Dans le cadre de Biocou, ils l'ont étés en juin 2016 et juin 2017. Les résultats sont présentés avec la cartographie de la parcelle, dans la section suivante.

B. Essai de Bergheim

L'essai combinant jachère à effet bionématicide et granulés de sainfoin fourni par notre partenaire Multifolia a démarré à la fin du projet Biocou, soit en

Résultats

Les travaux de Laure Villate (2013) ont consisté à suivre l'évolution de population de *X. index* en présence de différentes plantes couvre-sol. Les résultats obtenus ont mis en évidence le potentiel antagoniste des plantes de la famille des Fabacées (fig.5). Ces résultats ont été poursuivis dans le cadre du projet BIOCOU, et les expérimentations se sont focalisées sur trois Fabacées : le lotier corniculé, le trèfle violet et le sainfoin.

Les plantes utilisées durant le projet BIOCOU ont été cultivées en serre en conditions contrôlées durant 10 semaines dans de la terre prélevée dans un champs de sainfoin en Champagne. Ce substrat a été choisi en raison de la particularité des Fabacées à croître en symbiose avec des rhizobia (bactéries aérobies du sol). L'influence des rhizobia sur l'effet nématicide du sainfoin a été étudié postérieurement au projet BIOCOU, sans démontrer leur implication. Des échantillons de racines et de feuilles de Fabacées ont été utilisés lors de bioessais afin d'évaluer l'effet nématicide des différents compartiments des Fabacées. Ces échantillonnages ont par ailleurs été analysés en LC-MS afin d'identifier les molécules impliquées dans leur action antagoniste à X. index. Les expérimentations accomplies durant le projet BIOCOU ont donc suivi quatre axes de travail :

1. Etude de l'effet nématicide des différents compartiments des Fabacées

2. Etude du métabolome des trois Fabacées et analyse comparative des métabolites des Fabacées et du cépage de vigne Cabernet Sauvignon.

3. Evaluation de l'effet nématicide de molécules candidates par bioessais aqueux.

4. Suivi des expérimentations en vignoble avec Fabacées et porte-greffe résistant déjà en place, et mise en place d'un dispositif intégrant pour la première fois, un épandage de granulés de sainfoin.

Nom commun	Nom scientifique	Famille	% nématodes restants en pots
Vigne	*Vitis vinifera*	Vitaceae	> 1000
Sarrasin	*Fagopyrum esculentum*	Polygonaceae	594
Phacélie	*Phacelia tanacetifolia*	Hydrophullaceae	314
Chanvre	*Cannabis sativa*	Cannabaceae	233
Sorgho	*Sorghum vulgare*	Poaceae	208
Carvi	*Carum carvi*	Apiaceae	172
Tournesol	*Helianthus anuus*	Astéraceae	142
Rhue	*Ruta graveolens*	Rutaceae	139
Orge	*Hordeum vulgare*	Poaceae	131
Trèfle incarnat	*Trifolium incarnatum*	Fabaceae	122
Fétuque rouge	*Festuca rubra*	Poaceae	116
Cameline	camelina sativa	Brassicaceae	115
Zinnia	*Zinnia elegans*	Astéraceae	104
Cosmos	*Cosmos bipinnatus*	Astéraceae	100
Crotalaire	*Crotalaria spectabilis*	Fabaceae	98
Poireau	*Allium porrum*	Alliceae	98
Navet	*Brassica napus*	Brassicaceae	85
Seigle	*Secale cereale*	Poaceae	84
Triticale	*Triticosecale*	Poaceae	78
Melilot blanc	*Melilotus albus*	Fabaceae	73
Tagètes	*Tagetes patula*	Astéraceae	72
Navette	*Brassica rapa*	Brassicaceae	71
Nyger	*Guizotia abyssinica*	Asteraceae	67
Tagètes	*Tagetes minuta*	Astéraceae	65
Vesce velue	*Vicia villosa*	Fabaceae	61
Avoine	*Avena sativa*	Poaceae	59
Luzerne	*Medicago hybride*	Fabaceae	56
Sainfoin	*Onobrychis viciifolia*	Fabaceae	55
Trèfle violet	*Trifolium pratense*	Fabaceae	54
Lupin Blanc	*Lupinus albus*	Fabaceae	51
Lotier corniculé	*Lotus corniculatus*	Fabaceae	33

Fig.5 : Potentiel antagoniste des plantes couvre-sol contre *X. index* (adapté de Villate et aL, 2013)
31 espèces de plantes ont été cultivées en serre pendant 4 mois en présence d'une population de départ de *X. index* de 300 individus. L'évolution des populations de nématodes après 4 mois de culture (correspondant à 2 cycles de reproduction pour *X. index*) a été estimée par comptage manuel. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage par rapport à la population initiale de nématodes.
Surligné en jaune : les plantes favorables au développement des populations de *X. index* ; en blanc : plantes sans impact sur l'évolution des populations de *X. index* ; surligné en vert : plantes antagonistes au développement des populations de *X. index*.

1. Etude de l'effet nématicide des différents compartiments des Fabacées

L'effet nématicide de solutions concentrées de racines de Fabacées et de vignes, mais également de granulés de sainfoin et de feuilles lyophilisées de lotier et de trèfle, a été évalué lors de bioessais aqueux. *X. index* à la particularité de pouvoir survivre pendant plusieurs semaines dans l'eau, ce qui autorise l'évaluation de l'effet antagoniste d'une ou plusieurs molécules solubilisées en solution aqueuse. Les bioessais ont été réalisés sur des lots de 50 nématodes mis en suspension dans des solutions d'eau commercialisée, afin de conserver une composition en sels minéraux identique entre les différents essais. Les nématodes étant sensibles aux solutions acides, le pH des infusions de racines et de feuilles a été systématiquement vérifié (pH compris entre 6,8 et 7,9) et 1% de tampon phosphate a été rajouté aux bioessais afin de conserver un pH constant. Le taux de mortalité a été suivi durant trois jours et des analyses statistiques réalisées sur les effectifs.

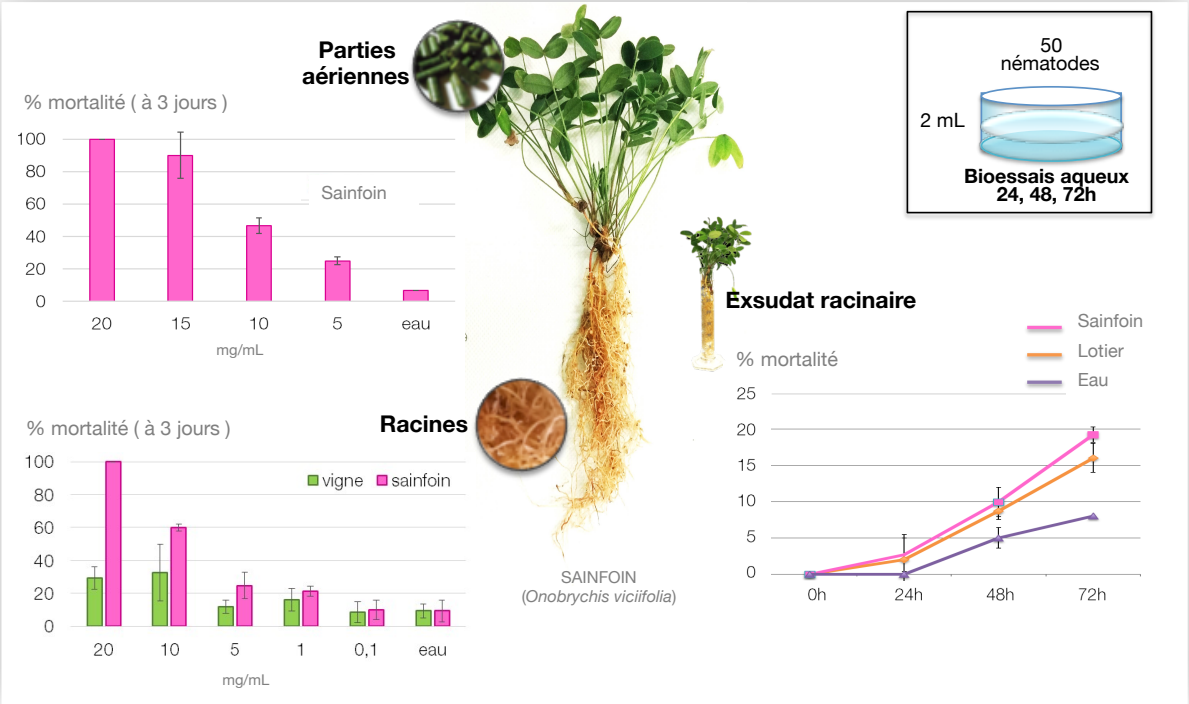


Fig.6 : <u>Etude de l'effet nématicide des différents compartiments du sainfoin</u>
Les parties aériennes (sous forme de granulés déshydratés), les racines et les exsudats racinaires de plants de sainfoin ont été déshydratés, infusés dans de l'eau minérale puis évalués comme potentielles solutions nématicides. 50 nématodes ont été plongés dans 2mL des solutions à tester et leur survie a été suivie durant trois jours à 20°C.
Ces résultats représentent le pourcentage de mortalité observée après trois jours en fonction de la concentration des solutions testées.
La DL_{50} à 3 jours est obtenue dès 10 $mg.mL^{-1}$ pour les infusions de racines et de granulés de sainfoin. Les taux de mortalité dans les exsudats racinaires n'excèdent pas 22%, mais cette mortalité est significativement plus haute que celle observée dans les témoins eau (6%).

Les taux de mortalité observés sont identiques pour les trois Fabacées, avec une Dose Létale DL_{50} à 3 jours de 10 $mg.mL^{-1}$ des infusions racinaires ou foliaires. La survie des nématodes en présence d'extraits aqueux de racines de Fabacées a été comparée avec celle observée en présence de solutions racinaires de Cabernet Sauvignon. Les taux de mortalité constatés en présence des solutions racinaires de vigne sont systématiquement plus bas qu'en présence de solutions de sainfoin. Dès 5 $mg.mL^{-1}$, la mortalité observée dans les solutions de vigne n'est plus significativement différente de celle des témoins eau. Une comparaison identique entre solutions de granulés de sainfoin et feuilles de vigne n'a pas pu être réalisée en raison du pH très acides des feuilles de vigne (pH3 - 4). Les exsudats racinaires présentent un effet nématicide moins importants, mais ces résultats s'expliquent par la très faible concentration moléculaire de ces solutions (fig.6 et 7).

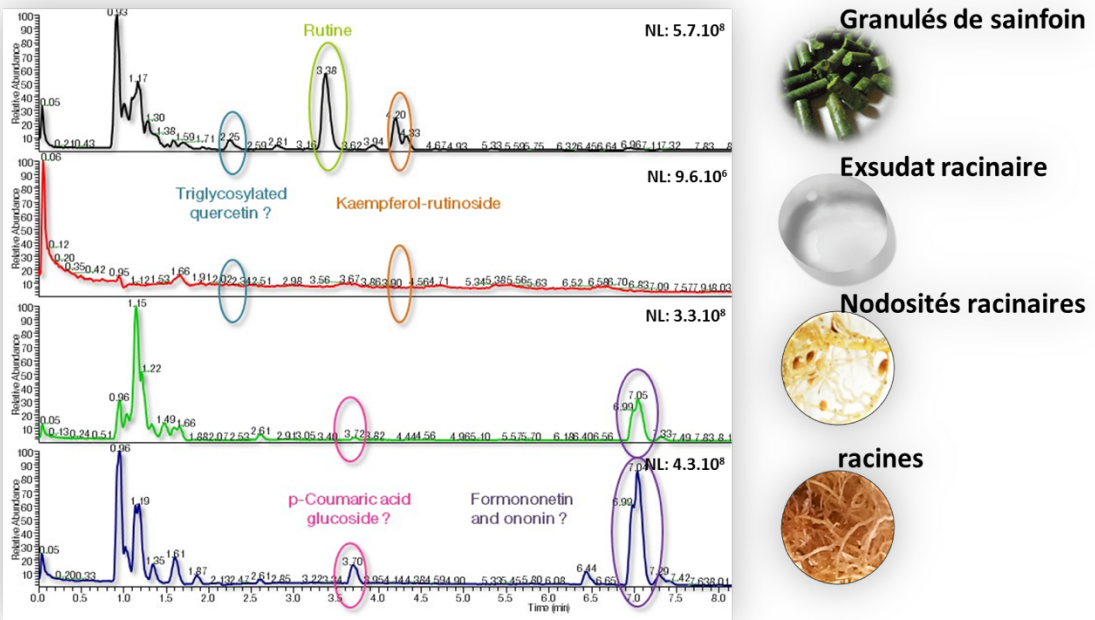


Fig.7 : Comparaison des courants d'ions totaux obtenus après injection en LC-MS des différents compartiments du sainfoin.
Les échantillons ont été injectés en LC-MS après extraction au méthanol. Ces courant d'ions totaux représentent l'intensité de détection des ions au cours du temps d'injection (unité arbitraire). L'indice NL correspond à l'intensité de détection la plus élevée. Usuellement, nous considérons qu'un indice NL supérieur ou égal à $9{,}9.10^8$ traduit une saturation de la LC-MS. A l'inverse, en dessous de 1.10^4 d'intensité de détection, nous considérons que le signal se situe au niveau du bruit de fond.

Ces essais ont permis de mettre en évidence l'effet nématicide des parties racinaires et aériennes des Fabacées étudiées. Les observations en cinétiques ont en outre mis en évidence l'importance de l'effet dose et de la durée d'exposition dans l'augmentation de la mortalité.

2. Etude par bioessais sol de l'effet nématicide des granulés de sainfoin commercialisés par MULTIFOLIA .

Lors des bioessais aqueux, les parties aériennes de sainfoin conditionnées sous la forme de granulés ont présenté d'étonnantes propriétés nématicides sur *X. index.* Ces granulés constituent une alternative intéressante à la culture en jachère des Fabacées, en raison des faibles contraintes impliquées à leur manipulation, leur stockage et leur conservation. Afin de valider leur potentiel nématicide et d'apporter une première estimation du coût d'utilisation de ces granulés, des bioessais-sol ont été menés en laboratoire ainsi que des essais grandeur nature dans des sols viticoles en jachères.

Les bioessais sol ont été réalisés à partir de 100 g de terre d'élevage (300 nématodes pour 100 g de terre en moyenne), dans lesquels une quantité de granulés finement broyés a été

rajoutés. Les bioessais sol ont été conservés durant 3 à 5 jours dans l'obscurité et à une température de 18°C.

Durant les premiers essais, des moisissures sont apparues à la surface des échantillons à la suite de la dégradation de la poudre de sainfoin et d'une mauvaise oxygénation de l'essai. La présence de ce mycélium entrainait une augmentation de mortalité des nématodes et ne permettait pas d'évaluer l'effet nématicide direct des granulés. Cependant il est intéressant de noter cet effet indirect, et d'identifier ces moisissures afin de comprendre la raison de cette augmentation de mortalité dans les populations de nématodes.

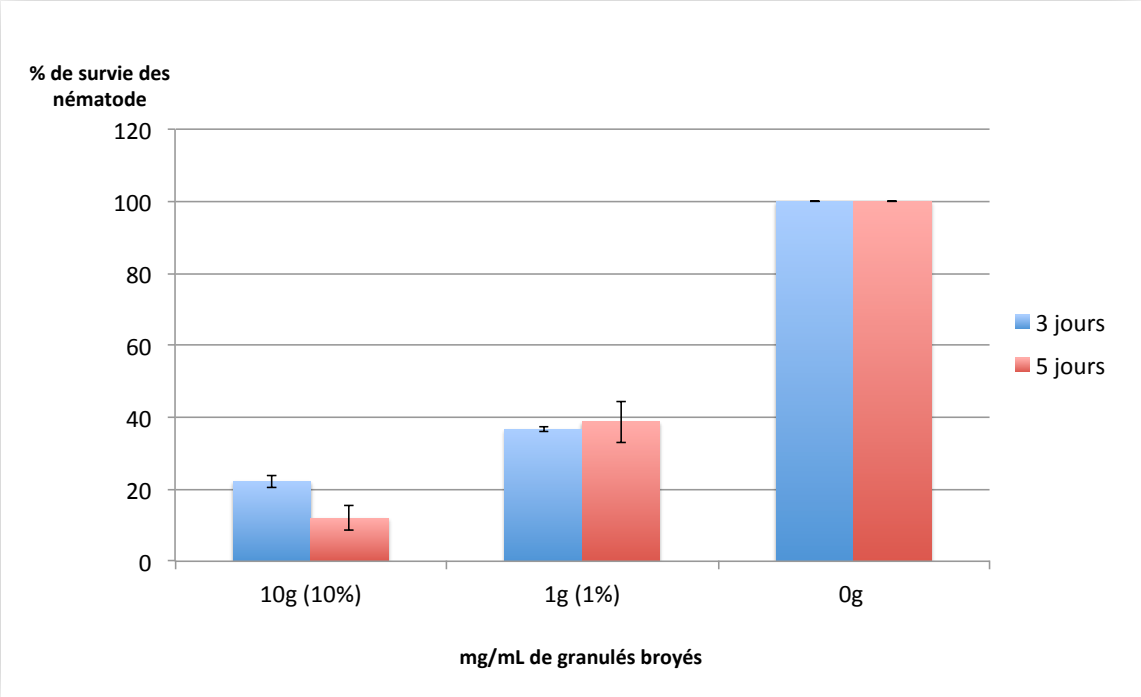


Fig.8 : Etude de l'effet nématicide des granulés de sainfoin lors des bioessais sol
Les granulés de sainfoin ont été finement broyés et mélangés à 100 g de terre d'élevages de *X. index*.
Ces résultats représentent le pourcentage de survie des nématodes après 3 et 5 jours, en fonction de la quantité de granulés rajoutés.
Après 3 jours, seulement 22% des nématodes ont survécu dans les bioessais à 10% de granulés. Le taux de survie tombe à 12% après 5 jours. Le taux de survie des nématodes ne varie pas de façon significative lors des bioessais à 1% de granulés (37% après 3 jours, 39% après 5 jours)

Les essais suivants ont consisté à placer la terre d'élevage dans des boites de pétri percées de petits trous. Cette méthode a permis une meilleure aération des essais et une très forte diminution de la propagation des moisissures. 3 jours après le début de l'expérience, la terre d'élevage de la moitié des essais a été passé sur des tamis afin d'isoler les nématodes vivants et de les compter. Dans les bioessais à 10% de granulés, 78% des nématodes sont morts, tandis que les nématodes qui ont survécu sont très peu motiles. Après 5 jours d'essai, le taux de mortalité augmente jusqu'à 88%, mettant en évidence dans ces conditions l'importance de la

durée d'exposition. Cependant, contrairement à la concentration, le temps n'est pas un facteur déterminant dans la diminution de la population de nématodes des bioessais à 5% de granulés. En effet, bien que le taux de survie soit nettement inférieur aux témoins de l'expérience (38% en moyenne dans les essais à 5%, 100% dans les essais sans granulés), il n'est pas significativement différent après 3 et 5 jours d'exposition (fig.8).

3. Etude du métabolome des trois Fabacées et analyses comparatives des métabolites des Fabacées et du cépage de vigne Cabernet Sauvignon.

Les feuilles et racines lyophilisées de Fabacées et de vignes ont été extraites au méthanol et au chloroforme. Cette procédure d'extraction permet de recueillir une large gamme de composées hydrophiles (flavonoïdes, monomères et dimères de tanins, phytohormones…) et hydrophobes (saponines, tanins condensés…). Les extraits ont été ensuite analysés en chromatographie liquide à haute performance suivie de la spectrométrie de masse (LC-MS) et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel R et du package Xcms. L'analyse comparative de ces ions a permis d'en identifier 18, spécifiques des Fabacées et non détectés dans la vigne, sur une moyenne de 1000 ions par plante. L'identité de certains de ces ions a été clairement établie après injection des standards commercialisés. Ces molécules comprennent des phytohormones, des flavonoïdes et des molécules de la famille des glucosinolates. Des pyrazines ont également été détectées dans les Fabacées. Ces molécules sont responsables de l'odeur de poivron ou de petit-pois qui se dégagent du substrat de culture et des plants de Fabacées. Cependant, bien que non détectées dans les feuilles et les racines de vignes, ces molécules n'ont pas été intégrées dans notre analyse en raison de leur nature volatile et de leur très faible intensité de détection dans les échantillons lyophilisés de Fabacées (fig.9). Les pyrazines feront l'objet d'un futur projet, pour tester leurs propriétés nématicides.

Les méthodes d'extraction et de séparation moléculaire utilisées à l'INRA de Colmar ne permettent pas à l'heure actuelle de détecter les polymères de tanins condensés. De plus, la structure des tanins condensés de sainfoin n'est pas connue. Cependant, il est possible de détecter et d'identifier les monomères et les dimères de tanins. Deux monomères de tanins ont été fortement détectés et identifiés comme communs aux racines et aux parties foliaires de la vigne et des Fabacées.

Les analyses métabolomiques comparatives entre vigne et Fabacées ont également permis d'identifier quelques molécules communes aux métabolomes des Fabacées et du cépage Cabernet Sauvignon, mais présentant une intensité de détection 100 à 1000 fois plus importantes dans les Fabacées. Ces molécules comprennent des dérivés de quercétine (un flavanol) dont la rutine, qui est particulièrement concentré dans les granulés de sainfoin (fig.7 et tableau 1). De plus, certaines molécules décrites dans la bibliographie comme potentielles nématicides ont été spécifiquement recherchées (cf. tableau 1). Les analyses LC-MS en ciblées consistent à se procurer la molécule d'intérêt et à l'injecter seule afin de déterminer son

temps de rétention sur la colonne chromatographique et son spectre de fragmentation. A partir de ces informations, la molécule peut ensuite être identifiée dans un mélange complexe. D'après les résultats obtenus lors de la recherche ciblée, la quercitrine, l'astragaline, la miquelianine et l'épicatéchine sont détectées dans la vigne et les fabacées, dans les mêmes organes, et avec des intensités de même ordre de grandeur. Concernant les autres monomères de tanins, la gallocatéchine n'est que faiblement détectée dans les feuilles de lotier et de sainfoin, tandis que son épimère, l'epigallocatéchine, est détectée dans les feuilles de sainfoin, lotier et vigne, ainsi que dans système racinaire de la de vigne et de lotier. La procyanidine A2 est faiblement détectée dans les échantillons et plus majoritairement dans les systèmes racinaires de la vigne et du lotier. La procyanidine B2 est présente dans les parties aériennes et racinaires du lotier, du sainfoin et de la vigne.

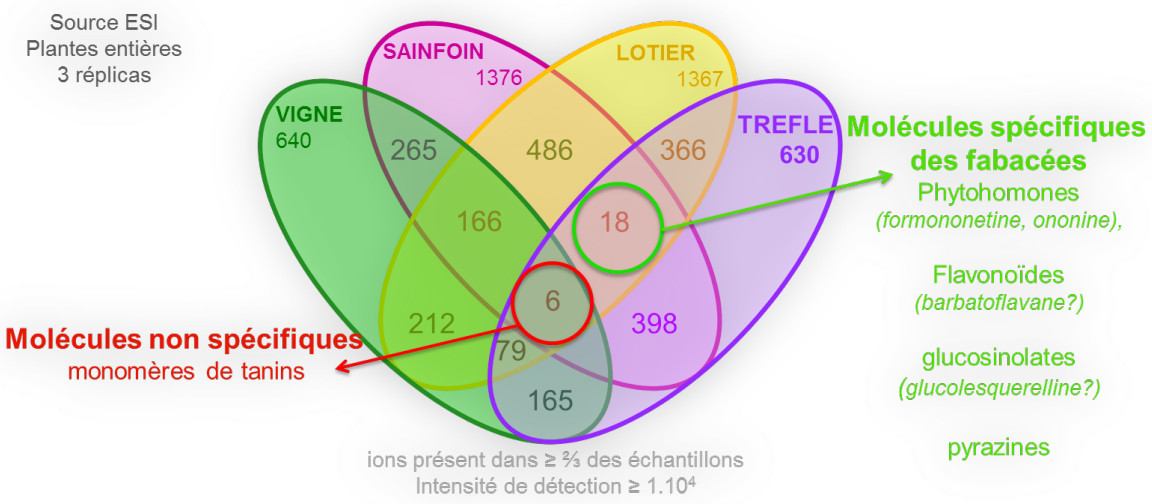


Fig.9 : Nombres d'ions détectés et spécificité des métabolomes des plantes étudiées
Ce diagramme de Venn représente la quantité d'ions restants après traitement par le logiciel R des données obtenues en LC-MS. Chaque ellipse représente l'ensemble des ions détectés dans une plante entière. 18 ions sont communs au sainfoin, au lotier et au trèfle. Ces ions appartiennent à la famille des phytohormones, aux flavonoïdes ou aux glucosinolates. 6 ions sont communs à toutes les plantes étudiées. 2 correspondent à des monomères de tanins.

			Feuilles				Racines				Nodosités			
nom	**classe**	**synonyme**	**vigne**	**lotier**	**trèfle**	**sainfoin**	**vigne**	**lotier**	**trèfle**	**sainfoin**	**vigne**	**lotier**	**trèfle**	**sainfoin**
arbutin	hydroquinone	4-hydroxyphenyl-β-D-glucopyranoside	1,16E+04	1,26E+03	8,83E+02	1,28E+04	3,05E+03	2,02E+03	0,00E+00	3,31E+02	2,01E+03	2,39E+03	0,00E+00	3,46E+03
gallocatechine	flavan-3-ol		1,74E+03	1,75E+04	1,47E+03	9,87E+04	1,36E+03	8,13E+03	1,23E+03	4,80E+02	7,22E+02	5,15E+03	2,42E+03	0,00E+00
epigallocatechine	flavan-3-ol		2,16E+05	4,35E+05	3,33E+02	2,06E+05	3,49E+05	3,18E+05	1,13E+03	6,33E+02	1,75E+05	1,54E+04	2,42E+03	0,00E+00
catéchine	flavan-3-ol		2,62E+06	7,05E+06	1,51E+06	1,11E+05	1,33E+07	2,55E+07	3,29E+05	3,96E+04	2,09E+07	4,93E+06	3,13E+05	4,49E+05
épicatéchine	flavan-3-ol		2,63E+06	2,66E+06	9,42E+04	3,80E+06	3,03E+06	1,74E+06	3,94E+04	1,57E+05	1,22E+07	4,14E+05	2,85E+04	1,71E+06
procyanidine A2	flavan-3-ol	Epicatechin-(2β→7,4β→8)-epicatechin	6,36E+03	3,16E+04	0,00E+00	0,00E+00	2,02E+04	1,07E+05	0,00E+00	0,00E+00	2,12E+04	7,29E+03	0,00E+00	0,00E+00
procyanidine B2	flavan-3-ol	épicatechin-(4β->8)-épicatechin	6,34E+05	4,64E+06	4,25E+03	4,59E+05	5,97E+06	6,57E+06	1,05E+03	8,36E+03	7,07E+06	1,52E+06	5,15E+03	2,55E+04
narcissoside	favonol	Quercetin 3'-methyl ether 3-rutinoside	0,00E+00	0,00E+00	1,16E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,01E+03	1,88E+06	2,02E+02	0,00E+00	8,62E+02	1,27E+06	0,00E+00
quercitrine	favonol	Quercetin 3-rhamnoside	2,63E+06	1,81E+05	6,88E+04	3,39E+05	1,25E+05	3,25E+05	1,98E+05	1,15E+05	1,65E+05	1,56E+04	5,48E+04	4,45E+04
Miquelianine	favonol	quercetine-3-glucuronide	1,30E+07	1,80E+04	1,31E+04	4,22E+03	1,15E+04	2,72E+04	3,44E+04	9,91E+04	5,89E+02	2,26E+03	6,57E+03	4,54E+03
rutine	favonol	quercetin-3-rutinoside	3,06E+05	7,59E+04	2,07E+05	4,74E+07	1,61E+03	4,35E+03	3,62E+04	9,73E+03	7,12E+02	9,22E+02	4,73E+04	4,72E+04
kaempferol	favonol		3,93E+03	1,01E+05	1,35E+05	1,56E+06	1,38E+02	1,75E+02	4,12E+04	0,00E+00	6,90E+04	0,00E+00	4,25E+04	2,30E+03
Nicotiflorine	favonol	kaempferol-3-rutinoside	1,32E+05	4,06E+07	0,00E+00	5,07E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,87E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
astragaline	favonol	kaempferol-3-glucoside	2,67E+06	1,84E+05	6,72E+04	3,48E+05	1,25E+05	3,25E+05	2,00E+05	1,15E+05	1,66E+05	1,64E+04	5,13E+04	4,36E+04
luteolin	flavone		5,86E+04	2,75E+06	3,16E+04	2,48E+04	2,10E+03	8,92E+03	4,52E+03	2,37E+03	1,16E+03	0,00E+00	1,88E+03	7,13E+02
orientine	flavone	luteoline-8-glucoside	0,00E+00	9,40E+04	4,21E+05	1,78E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,65E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,96E+03	0,00E+00
naringenin	flavanone		6,26E+03	8,87E+02	2,04E+03	0,00E+00	2,38E+03	9,41E+03	6,28E+04	1,16E+04	3,44E+04	2,59E+03	6,39E+04	3,08E+04
vitexine	flavone	Apigenine-8-glucoside	1,64E+04	7,80E+06	0,00E+00	2,04E+05	0,00E+00	1,58E+03	2,38E+03	2,24E+03	1,39E+03	2,34E+02	1,65E+02	0,00E+00

Tableau 1 : analyse spécifique de molécules à effet nématicide **:**

Les molécules ont été injectées pures afin d'identifier leur temps de rétention sur la colonne. Elles ont ensuite été recherchées dans les feuilles, les racines et les nodosités du lotier, du trèfle violet, du sainfoin et du cépage de vigne Cabernet sauvignon. Les résultats obtenus sont exprimés en intensité de détection (unité arbitraire). Les valeurs en dessous de 1.10^4 sont considérées comme étant du bruit de fond et apparaissent en rouge. Le vert correspond aux valeurs d'intensité de détection les plus hautes.

4. Evaluation de l'effet nématicide de molécules d'intérêts par bioessais aqueux

Dans la littérature, trois familles de molécules ont été identifiées comme ayant un potentiel nématicide. Il s'agit des saponines, des tanins et des flavonoïdes. A l'heure actuelle les premières analyses métabolomiques n'ont pas permis d'identifier de saponines spécifiques aux Fabacées et présentant une forte intensité de détection. D'autre part, la structure des tanins condensés des Fabacées n'est pas connue, et les monomères de tanins identifiés dans le sainfoin le trèfle et le lotier sont également présents dans la vigne, ce qui contrarie l'hypothèse de l'implication unique des tanins condensés dans les propriétés nématicides de ces espèces végétales.

La structure des tanins condensés des Fabacées n'étant ni connue ni commercialisée, seul l'effet sur la survie de *X. index* des monomères et de certains dimères de tanins commercialisés a pu être évalué. Ces bioessais ont été effectués dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les résultats obtenus au bout de trois jours n'ont pas permis de mettre en évidence un effet antagoniste de ces molécules sur la survie de *X. index*. En effet, les taux de mortalité à trois jours en présence des monomères et dimères de tanins sont très faibles et non significativement différents de ceux observés dans les témoins « eau ». Il est très probable qu'un effet synergique entre les tanins et d'autres molécules soient nécessaires pour obtenir un effet nématicide (fig.10).

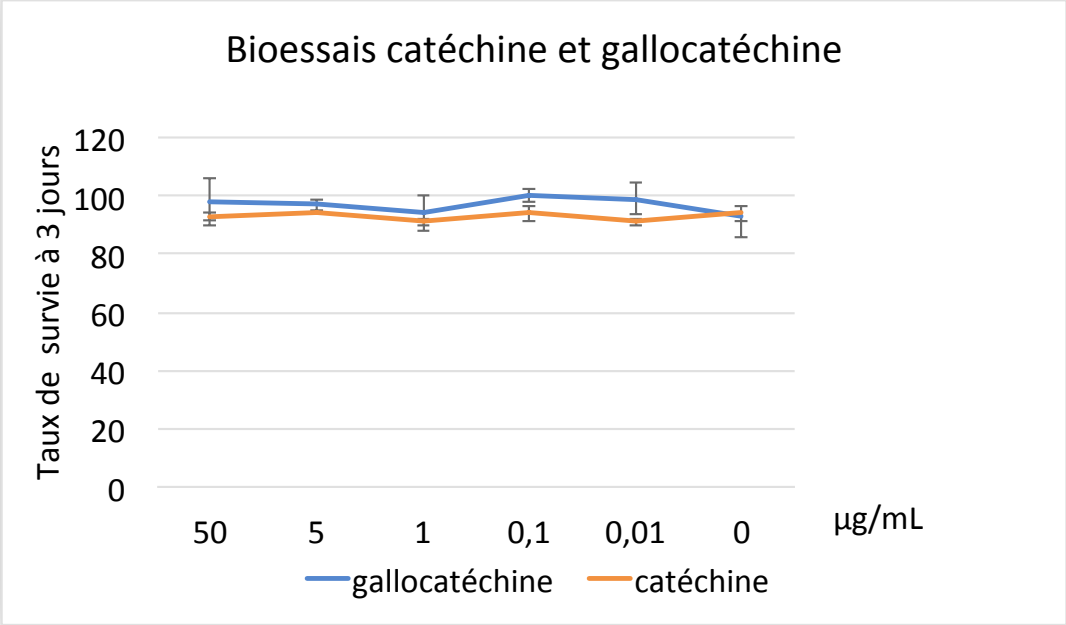


Fig.10 : Etude de l'effet nématicide de 2 monomères de tanin
Ce diagramme représente le pourrcennntage de survie de *X. index* dans des solutions de catéchinnne et de gallocatéchine pluss ou moins concentrées. Aucune des 2 molécules n'a montré d'influence sur la survie des nématodes.

En raison de sa très forte intensité de détection dans les granulés de sainfoin, l'effet antagoniste de la rutine sur *X. index* a également été évalué. Cependant, en raison de trop grande variabilité pour les DL50 entre les trois réplicas, ces bioessais n'ont pas pu mettre en évidence pour l'instant un éventuel effet nématicide de cette molécule.

5. Apparition d'un champignon « nématoparasite » dans les bioessais.

Etonnamment, lors de l'analyse de l'effet nématicide des monomères et dimères de tanins en bioessais aqueux, le nématoparasite ne se développait pas ou peu. Cet effet est dose dépendante, avec une augmentation du nombre de nématodes infectés inversement proportionnelle à la concentration de tanin. D'autres parts nous avons pu observer que les monomères de tanins inhibent plus fortement le développement du nématoparasite que les procyanidines testées (fig.11A et B).

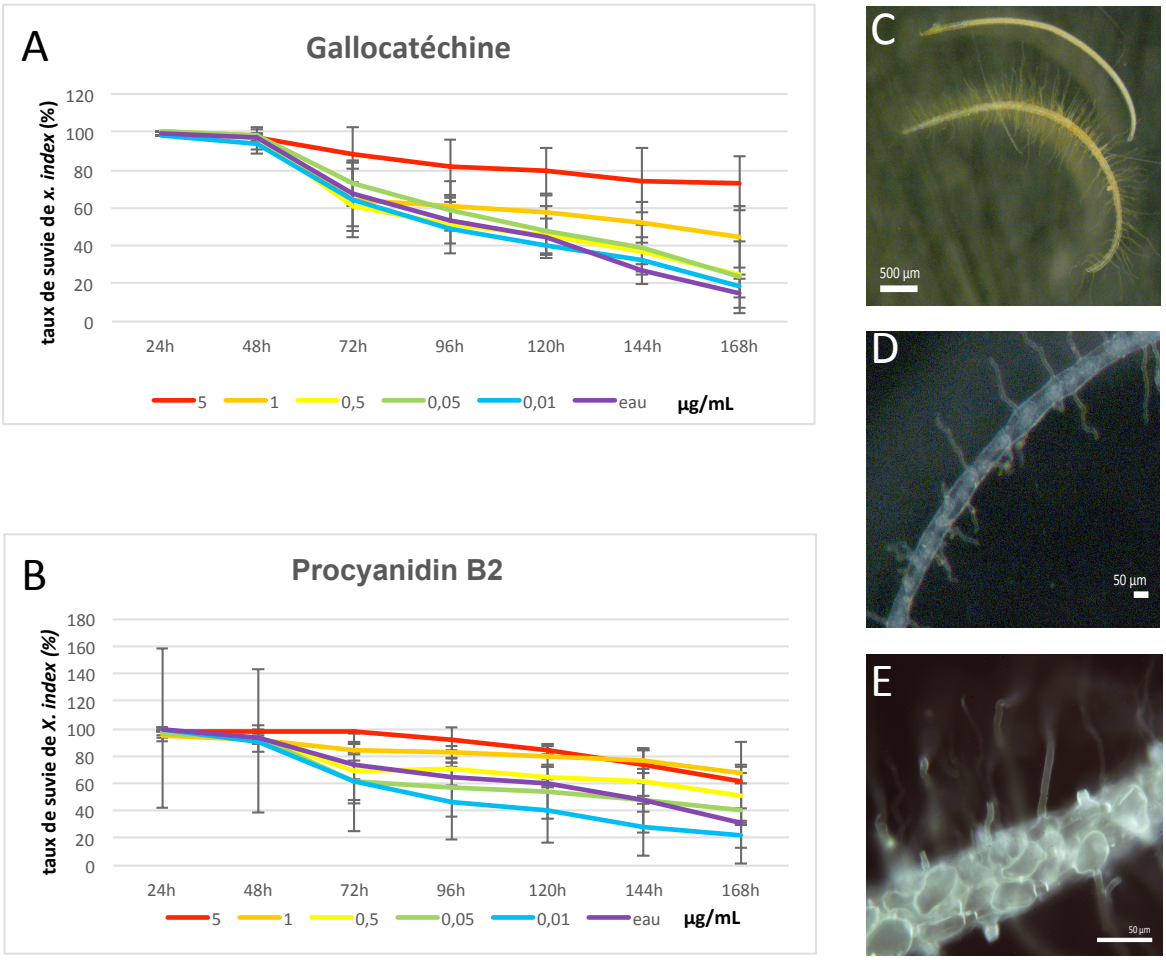


Fig.11 : Développement d'un nématoparasite.
Un nematoparasite s'est développé dans les élevages de *X. index* et a interféré le déroulement des essais.
A et B : résultats obtenus lors de l'évaluation du potentiel nématicide de la gallocatchine et de la procyanidine B2 en bioessais aqueux. Les diagrammes présentent le taux de survie des nématodes observé durant 7 jours et selon la concentration des solutions. On constate que la mortalité des nématodes est moins importante dans les solutions fortement concentrées en molécules de tanins. En effet, le champignon s'est propagé bien plus rapidement dans les solutions les moins concentrées, biaisant l'essais.
C et D : observation sous loupe binoculaire de nématodes infectés. C : le nématode en haut de la photo est un nématode mort sain. Le nématode situé en bas de la photo est mort suite à l'infection par le nématoparasite, transpercé par des hyphes. E. : observation sous microscope à épi-fluorescence après coloration au bleu d'aniline d 'un nématode infecté. Les hyphes semblent sortir d'un bulbe qui s'est développé à l'intérieur de *X. index*.

D'après sa structure et son développement, le nématoparasite pourrait être *Catenaria anguillulae (fig.7 C,D,E)*. Afin de confirmer son identité, une solution contenant des nématodes infectés a été étalée sur 4 milieux de culture différents. 12 champignons ont été isolés après 5 passages sur boites, leur séquence ITS a été amplifiée et envoyée en séquençage. Malheureusement, seuls 4 séquençages ont donné des résultats, en raison d'une contamination. L'identification du nématoparasite est toujours en cours.

6. Bilan partiel des expérimentations jachères en vignoble contaminé par le court-noué ; combinaison avec le porte-greffe Nemadex AB résistant au nématode ; mise en place du premier essai « granulés de sainfoin » en vignoble alsacien.

Le suivi des recontaminations par le virus du court-noué des 2 parcelles alsaciennes de Bernardswiller (Bas-Rhin) et de St Pierre (Bas-Rhin) montre qu'au bout de 2 années de jachère avec Luzerne et Vesce velue, le potentiel infectieux de la parcelle est toujours bien présent. Les premières contaminations des jeunes vignes par le virus du court-noué apparaissent dès la première année. A Bernardswiller, où la seule modalité de l'essai est l'utilisation d'une Fabacées en couvert de service pendant 2 années, et malgré la dévitalisation des ceps de l'ancienne vigne par herbicide, les cinétiques de recontamination sont statistiquement similaires entre les modalités. Cet essai a démarré en 2010 par 2 années de jachère et on assiste depuis 2 ans à une explosion de la contamination par le virus du court-noué.

Essai de St Pierre :

A St Pierre, où nous rajoutons l'utilisation du porte-greffe Nemadex AB avec la jachère de Fabacées, il semble y avoir au bout de la 3eme année moins de contamination, qu'avec les autres modalités. Ce résultat très préliminaire, et que nous espérons conforter par les analyses pluriannuelles à venir, indique déjà qu'une solution intégrée doit être envisagée pour espérer lutter efficacement contre ce dépérissement. Les analyses ELISA pour 2018 sont en cours et seront intégrées dans la dynamique pluriannuelles de re-contamination des différentes modalités. Par ailleurs, nous avons noté un effet positif de la jachère avec une Fabacées sur la vigueur de la jeune vigne, dès la première année. Voir figure ci-dessous :

Les premiers effets d'une jachère avec une Fabacées se manifestent au niveau de la vigueur : essai de St Pierre (67) – juin 2015

Vigueur jeunes vignes/Nemadex : +++

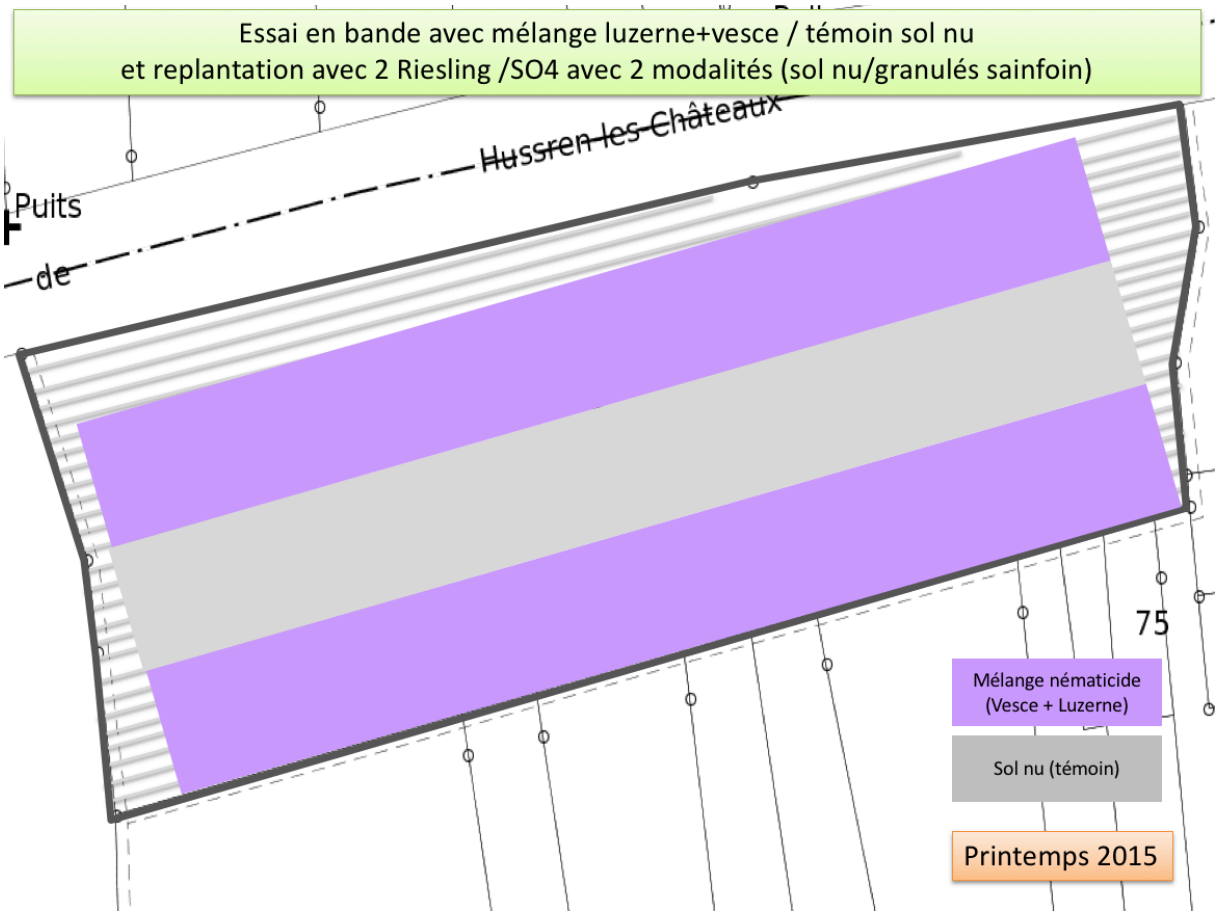
Vigueur jeunes vignes/Nemadex : +

PLAN ESSAI JACHERES EN BANDES SAINT PIERRE
Positifs GFLV
2016
2017
BLOC 4
BLOC 3
BLOC 2
BLOC 1
rg 1
rg 2
rg 3
rg 4
rg 5
CHEMIN
Sylvaner Cl 50/SO4
Sylvaner Cl 50/Némadex
ancienne bande de luzerne
ancienne bande sol nu

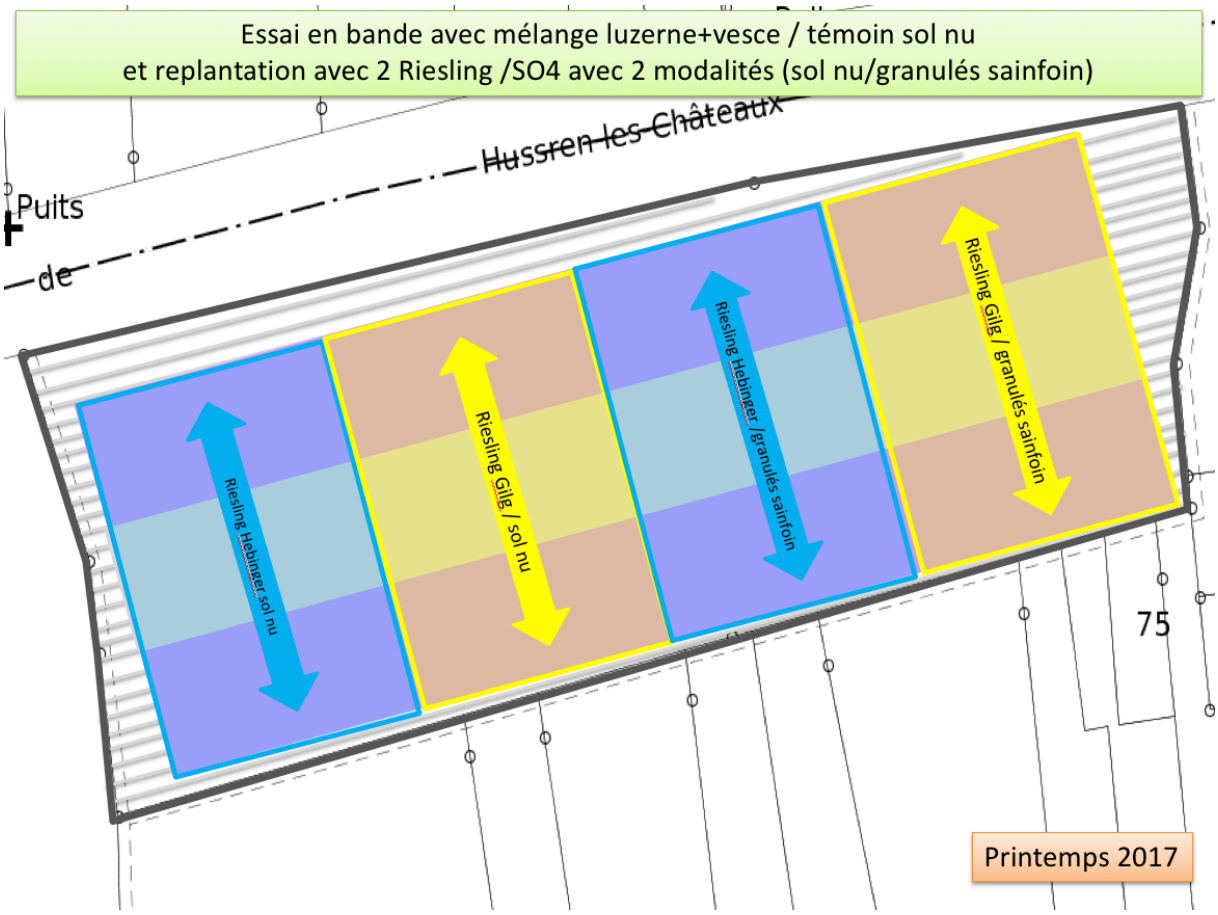
Essai de St Pierre (67). Les premiers ceps positifs au virus du court-noué (GFLV) apparaissent dans la modalité « porte-greffe conventionnel SO4 », que ce soit sur la bande « sol nu » ou bien sur la bande « luzerne ».

Essai de Bergheim :

La transformation par Multifolia des parties foliaires du sainfoin en granulés déshydratés n'altère pas ses propriétés « nématicides » et constitue une avancée technologique très intéressante pour le stockage, l'exportation, les manipulations et un éventuel épandage en parcelles viticoles. Ainsi, des épandages de granulés de sainfoin ont été effectués en avril 2017 sur une parcelle viticole infestée de court-noué à Bergheim (Haut-Rhin), et sur laquelle une jachère de 2 années de luzerne avait été mise en place en 2015. Voir dispositif expérimental ci-dessous.



Au printemps 2017, un épandage de granulés de sainfoin (10T/ha) et un enfouissement ont été réalisés sur cette parcelle, selon les modalités décrites ci-dessous.



Premiers éléments concrets d'un repos du sol « optimisé » : jachère de 2 ans et granulés de sainfoin en enfouissement avant plantation ; premier essai en Alsace en 2017

Jachère d'un mélange Luzerne-Vesce de 2 ans après dévitalisation et arrachage
Parcelle infestée de court-noué

Plantation le 22 mai 2017 :

Itinéraire technique innovant à associer à d'autres pratiques

Epandage de granulés de sainfoin 4 avril 2017 :
Effet combiné nématicide et fertilisation organique azotée ?

Un suivi des cinétiques de re-contamination par le virus du court-noué ainsi que l'effet direct sur les populations de nématodes dans ces essais jachères, permettra sur un moyen terme d'évaluer l'efficacité des granulés de sainfoin dans l'assainissement des terres contaminées par le pathosystème du court-noué (virus+vecteur). A partir de 2018, ce réseau de parcelles avec épandage de granulés de sainfoin va monter en puissance. En effet 12 parcelles sont en cours de mises en place et suivie par le Comité Champagne en partenariat avec la Chambre d'Agriculture du Vignoble Champenois et la société Multifolia. Les modalités retenues seront les suivantes : pour 9 parcelles, nous aurons 1 modalité sainfoin (3,5 T/ha) – 1 modalité « végéthumus » (4T/ha) – 1 modalité zéro apport ; pour 3 parcelles : 3 modalités sainfoin (3,5 T, 7T et 10,5 T/ha) + 1 modalité « végéthumus » (4T/ha) – 1 modalité zéro apport. Sur ces 3 parcelles nous ferons une évaluation de la biomasse et de l'activité microbienne du sol sur les différentes modalités et à 5 dates de prélèvements. Cela permettra de vérifier l'effet immédiat et à plus long terme des différentes doses de granulés de sainfoin sur la vie du sol. Ces prélèvements seront confiés pour analyse à l'entreprise RITTMO. En complément des ELISA pour évaluer la dynamique de recontamination par le court-noué, des mesures de vigueur seront effectuées par passage du « Physiocap » sur toutes les parcelles.

Néanmoins pour le suivi de ces essais, des financements seront nécessaires en particulier pour la réalisation des tests ELISA et les analyses de vigueur.

Conclusion

Les bioessais effectuées au sein de l'INRA de Colmar démontrent un effet antagoniste des Fabacées contre *X. index*. De plus, la transformation par MULTIFOLIA des parties foliaires du sainfoin en granulés déshydratés n'altère pas ses propriétés nématicides et constitue une avancée technologique très intéressante pour le stockage, l'exportation, les manipulations et un éventuel épandage en parcelles viticoles. Ainsi, des épandages de granulés de sainfoin ont été effectués en avril 2017 sur des parcelles viticoles infestées de court-noué. Un suivi des cinétiques de re-contamination par le virus du court-noué ainsi que l'effet direct sur les populations de nématodes dans ces essais jachères, permettra sur un moyen terme d'évaluer l'efficacité des granulés de sainfoin dans l'assainissement des terres contaminées par le pathosystème du court-noué (virus+vecteur). Les objectifs finalisés de cette étude seront de proposer aux viticulteurs un mode d'emploi efficace des granulés contre la propagation de la maladie et la restauration des sols viticoles fortement contaminés pour la replantation de jeunes vignes, et l'intégration de cette stratégie dans une approche globale de gestion intégrée et durable de la maladie exploitant des stratégies complémentaires de lutte, soit contre le virus soit contre le nématode .

L'identification des composés nématicides du sainfoin est toujours en cours. Les premières analyses LC-MS ont permis de sélectionner 18 ions candidats, spécifiquement produits dans les Fabacées, et appartenant principalement à la famille des flavonoïdes et des glucosinolates.

Bien que faiblement détectés par la méthode d'analyse LC-MS mise en place par l'INRA de Colmar, les pyrazines représentent des candidats sérieux et devraient être étudiés dans un projet ultérieur. En effet, la nature volatile de ces composés facilite leur diffusion dans la terre avoisinant les systèmes racinaires des Fabacées, et est responsable de l'odeur de petit-pois et de poivron qui se dégage du substrat de croissance de ces plantes. De plus ce sont des molécules qui semblent être produites de façon ubiquitaire dans les Fabacées, tandis qu'elles ne sont produites quasiment que dans les baies de la vigne. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse suivie de la spectrométrie de masse (GC-MS) devrait permettre de déterminer précisément la structure et la concentration de ces molécules dans les échantillons de sainfoin.
Des analyses en LC-MS et GC-MS des modifications chimiques du sol avant et après culture de Fabacées est proposée, afin de déterminer la teneur du sol après culture des Fabacées, en pyrazines et autres composés synthétisés par ces plantes. Les nématodes ne semblant pas se nourrir directement sur les racines de sainfoin, il est probable que les molécules nématicides soit directement exsudées dans le sol. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les exsudats racinaires de Fabacées présentent un effet antagoniste aux nématodes, mais la faible concentration en molécules de ces échantillons complique l'identification des molécules nématicides.

D'après la littérature, les tanins condensés sont des composés à effet nématicide reconnu, que soit en nématologie animale ou végétale. Cependant, la vigne qui est l'hôte principal de *X. index*, est une plante fortement productrice de tanins, et des monomères de tanins ont été identifiés dans des concentrations similaires dans les différents compartiments des Fabacées et du cépage de vigne Cabernet Sauvignon. De plus, l'absence d'information sur la structure des tanins condensés produits par le sainfoin rend difficile l'évaluation de leur potentiel nématicide. Dans une première approche, l'INRA de Colmar a évalué l'effet antagoniste des monomères et de deux dimères de tanins commercialisés. Ces molécules n'ont provoqué aucune altération de la survie des nématodes. Il est possible que le potentiel nématicide du sainfoin résulte de la synergie des tanins avec d'autres molécules, tel que démontré dans les travaux de Ropiak et al., (2016). Ropiak et al., ont également étudié les dégâts provoqués par les tanins au niveau des tissus externes de *Caenorhabditis elegans*. Une observation microscopique des lésions cuticulaires de *X. index* induites par les solutions de sainfoin est envisagée afin de comparer nos résultats et ceux publiés par Ropiak *et al.* Une extraction en laboratoire des tanins de sainfoin est également à l'étude afin d'évaluer l'effet nématicide de ces molécules complexes sur *X. index*. Cependant, les tanins condensés sont des molécules très hydrophobes, et leur évaluation nécessitera la mise en place d'un protocole spécifique de bioessais. D'autres molécules produites spécifiquement dans les trois Fabacées étudiées, comme la formononetine, présentent la même hydrophobicité, ce qui nécessitera une nouvelle approche des bioessais, prévus dans le futur projet. Enfin au niveau des perspectives pour approfondir l'étude des mécanismes mis en jeu et pour améliorer la robustesse des bioessais, une première sélection des molécules d'intérêts pourrait être effectuée par essais

sur le nématode modèle, *C. elegans*. En effet, ce nématode modèle est plus résistant et facile à manipuler que *X. index*. Les contraintes imposées pour la survie de *C. elegans* sont moins importantes, est permettraient d'augmenter drastiquement les populations à l'essai et le nombre de réplicas.

Enfin, l'objectif majeur de cette thématique consiste non pas à éradiquer le nématode vecteur, mais bien à inhiber sa capacité à transmettre le virus du court-noué. Ainsi nous prévoyons d'évaluer en conditions contrôlées (en serre), l'influence de ces espèces végétales «nématicides » sur la transmissibilité du GFLV. En effet, outre l'effet réducteur des populations de nématodes, ces espèces végétales, non-hôtes du virus pourraient avoir un effet sur la diminution également des populations de nématodes hébergeant le virus (perte de viruliférité des nématodes), étant donné que le virus est perdu à chaque mue du nématode. Dans le même ordre d'idée, il sera intéressant de vérifier si un nématode au contact d'une de ces plantes nématicides, entière ou déshydratée (granulés) ou encore en ayant été préalablement traité avec les molécules antagonistes identifiées, sera en mesure soit d'acquérir, soit de transmettre le virus.

En partenariat avec la société Multifolia, de nouveaux essais démarrant en 2018, au nombre de 12 et localisés en Champagne, intègreront parmi d'autres paramètres d'étude, l'adjonction de granulés de sainfoin, avant replantation. L'élaboration de ces nouveaux dispositifs expérimentaux est directement un livrable du projet Biocou. L'ensemble de ces expérimentations en vignoble devraient nous permettre d'identifier des itinéraires techniques innovants, qui en association avec les autres stratégies développées à l'INRA de Colmar devraient nous permettre d'initier des essais systèmes pour valider une stratégie intégrée de gestion durable du court-noué et de répondre efficacement et durablement à la problématique du dépérissement dû au court-noué.

Le comportement du porte-greffe Nemadex AB démontre que le concept de résistance au nématode issue de la muscadine est à exploiter. L'obtention de cette première variété ouvre donc la voie à la création d'autres porte-greffes plus performants et potentiellement plus résistants au virus par une résistance accrue vis-à-vis du nématode. De même les travaux préliminaires sur la prémunition montrent que cette stratégie de protection dérivée du pathogène par l'utilisation de souche virale de GFLV hypoagressive pourra être intégrée à l'utilisation de jachères à effet nématicide et d'itinéraires techniques exploitant les bionématicides.

En perspective de Biocou, l'identification de traceurs métaboliques permettra d'une part de contribuer à l'amélioration génétique de ces Fabacées à effet nématicide en partenariat avec un semencier, mais aussi de contrôler la qualité des plantes couvre-sol et des granulés et de réaliser des fiches « produit » pour les marchés ciblés. Ce projet devra permettre à la filière sainfoin française de se positionner sur un marché en émergence, celui du biocontrôle végétal.

Les objectifs finalisés de cette étude seront de proposer aux viticulteurs un mode d'emploi efficace des granulés de sainfoin et plus généralement des Fabacées, contre la propagation de la maladie et la restauration des sols viticoles fortement contaminés pour la replantation de jeunes vignes, et l'intégration de cette stratégie dans une approche globale de gestion intégrée et durable de la maladie exploitant des stratégies complémentaires de lutte, soit antivirale soit anti-vectorielle.

Références :

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., & Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) on the in vitro larval migration of Haemonchus contortus: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology,* 131*(4), 531-538.*

Bouquet, A., Danglot, Y., Torregrosa, L., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., Esmenjaud, D., & Dalmasso, A. (2000). Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread, using. *Vitis*, 517-526.

Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., & Mathieu, C. (2016). In vitro susceptibility of ten Haemonchus contortus isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary parasitology,* 217*, 53-60.*

Desrues, O., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Mueller-Harvey, I., Enemark, H. L., & Thamsborg, S. M. (2016). Impact of chemical structure of flavanol monomers and condensed tannins on in vitro anthelmintic activity against bovine nematodes. *Parasitology*, *143*(4), 444-454.

Esmenjaud, D., & Bouquet, A. (2009). Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management. In Integrated Management of Fruit Crops Nematodes (pp. 195-214). *Springer*, Dordrecht.

Esmenjaud, D., Van Ghelder, C., Voisin, R., Bordenave, L., Decroocq, S., Bouquet, A., & Ollat, N. (2010). Host suitability of Vitis and Vitis-Muscadinia material to the nematode Xiphinema index over one to four years. American journal of enology and viticulture, 61(1), 96-101.

Fukushima, E. O., Seki, H., & Muranaka, T. (2014). Heterologous Expression of Triterpene Biosynthetic Genes in Yeast and Subsequent Metabolite Identification Through GC-MS. *In Plant Isoprenoids* (pp. 235-243). Humana Press, New York, NY.

Gaudin, E., Simon, M., Quijada, J., Schelcher, F., Sutra, J. F., Lespine, A., & Hoste, H. (2016). Efficacy of sainfoin (Onobrychis viciifolia) pellets against multi resistant Haemonchus contortus and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Veterinary parasitology*, *227*, 122-129.

Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., ... & Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, *212*(1-2), 5-17.

Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., & Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of Haemonchus contortus exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *5*(3), 127-134.

Kushiro, T., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (1998). β-Amyrin synthase. *The FEBS Journal*, 256(1), 238-244.

Ma, P., & Xia, X. (2011). Factors affecting splicing strength of yeast genes. *Comparative and functional genomics*, 2011.

Mengistu, G., Hoste, H., Karonen, M., Salminen, J. P., Hendriks, W. H., & Pellikaan, W. F. (2017). The in vitro anthelmintic properties of browse plant species against Haemonchus contortus is determined by the polyphenol content and composition*. Veterinary parasitology,* 237*, 110-116.*

Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003). Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of Trichostrongylus colubriformis and Teladorsagia circumcincta in goats. *Veterinary Research,* 34*(3), 331-339.*

Pensec, F., Marmonier, A., Marchal, A., Gersch, S., Nassr, N., Chong, J., ... & Bertsch, C. (2013). Gypsophila paniculata root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *19*(3), 439-445

Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., & Hoste, H. (2015). Anthelmintic activities against Haemonchus contortus or Trichostrongylus colubriformis from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(28), 6346-6354.

Ropiak, H. M., Ramsay, A., & Mueller-Harvey, I. (2016). Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *121*, 225-231.

Villate, L., Morin, E., Demangeat, G., Van Helden, M., & Esmenjaud, D. (2012). Control of Xiphinema index populations by fallow plants under greenhouse and field conditions. *Phytopathology*, *102*(6), 627-634.

Yofe, I., Zafrir, Z., Blau, R., Schuldiner, M., Tuller, T., Shapiro, E., & Ben-Yehezkel, T. (2014). Accurate, model-based tuning of synthetic gene expression using introns in S. cerevisiae. *PLoS genetics*, 10(6), e1004407.

Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Katiki, L. M., Costa-Júnior, L. M., Tamboura, H. H., ... & Louvandini, H. (2017). Comparison of the in vitro anthelmintic effects of Acacia nilotica and Acacia raddiana. *Parasite*, *24*.

ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

RESUMES COLLOQUE DE VIROLOGIE D'AUSSOIS DE JANVIER 2017

BIOCOU project: nematicide fallow against grapevine fanleaf.

NEGREL lise, ESMENJAUD Daniel, LAVEAU Coralie, MARCHAL Axel, BERTSCH Christophe, LEMAIRE Olivier

Grapevine Fanleaf is a disease transmitted by nematodes (Xiphinema index) and responsible for grapevine dieback. Only prophylactic methods help to fight against the spreading of the disease. They consist of planting healthy and certified seed and, in infected vineyards, devitalizing and uprooting the virus-infected grapevines before fallowing infected parcel. This fallow is necessary to sanitize the field before replanting.

Experiments under controlled conditions in greenhouses and vineyards have shown that some groundcover plants of the Fabaceae family have an antagonistic effect against *X. index*. Plants with the most effective nematicide effect have been described as producing saponins and triterpene compounds. Their nematicide activity is linked to saponin exudations in the ground and to the action of other molecules that are still to be identified.

Planted in the vineyard during the fallow period following vineyard infection, these groundcover plants would therefore effectively reduce the infectivity of the soil and shorten the duration of fallow period needed.

In this context, BIOCOU project has three objectives. To analyze the root exsudates of nematicide plants, using LC-MS technic, and test the direct effect of these exudates on nematode mortality. Studying these groundcover plants will allow the characterisation of their mode of action and highlight new nematicides. It will also offer to the winegrowers a range of plants able to have antagonistic action against nematodes. Furthermore, a test combining fallow groundcover and resistant rootstocks (Nemadex AB) will evaluate the impact of this combinaison on the soil infectivity, hoping to see a diminution in number of resistant nematodes. Finally, the resistance sustainability of this combinaison will be studied over several years by analysing the re-contamination kinetics.

BIOCOU: a bionematicide strategy to control *Xiphinema index*, a nematode vector of the grapevine fanleaf degeneration disease

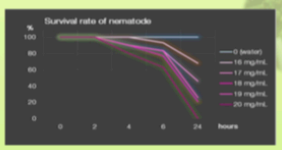
Lise Negrel*, Lauriane Renaud, Raymonde Baltenweck, Gérard Demangeat, Aurélie Marmonier, Philippe Hugueney, Olivier Lemaire

The ectoparasite soil-borne nematode *Xiphinema index* transmits the *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), the major causal agent of the fanleaf degeneration, one of the most detrimental grapevine disease (Andret *et al.*, 2004). The main features of the virus/vector pathosystem is its persistence over long periods of time, explaining the perpetual recontamination of the grapevine plots (Lemaire *et al.*, 2016). With the ban of synthetic nematicides, there is currently no technical solutions to control nematode populations in the vineyards.
Recently, groundcover plants belonging to the *Fabaceae* family have shown antagonistic effects against *X. index* (Villate *et al.*, 2008). Their bionematicide activity could be linked to molecule exudations in the rhizophere. However, no specific nematicide molecule has been characterized so far.

The objective of the BIOCOU project is to identify specific molecules with high nematicide potential from selected plants. To address this issue, non-targeted analyses of whole plant metabolome will be associated with nematode bioassays. Here, we present the preliminary results obtained with sainfoin (*Onobrychis vicifolia*), a plant that produced condensed-tannins known to alter the biology of animal-infecting nematodes (Gaudin *et al.*, 2016). Therefore sainfoin represents a good candidate to investigate for biologically-active molecules against *X. index*.

Nematode bioassays: Does sainfoin exhibit nematicide properties on *X. index*?

Aerial parts (granules), preliminary data

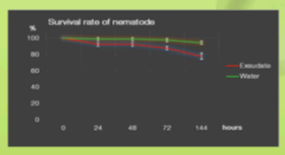


X. index were incubated in 2 mL of water-suspended sainfoin granules at different concentrations or within 2 mL of water as negative control. Living nematodes were counted within a 24h period of time.

Living nematode

Dead nematode

Root exsudates



X. index were exposed to root exudates (1,5 g dry roots /30 mL water) or incubated with water as negative control. Living nematodes were monitored within a 114 h period of time.

SAINFOIN (*Onobrychis vicifolia*)

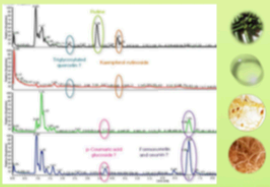
- Highly melliferous (Deveci *et al.*, 2012)
- Bioremediation (Beladi *et al.*, 2011)
- Soil fertilizer (Cui *et al.*, 2014)
- Forage and vermifuge (Carbonero *et al.*, 2011)
- **Bionematicide ?**

Metabolomic analysis: What are the metabolomic profiles of the 4 compartments?

Dionex Ultimate 3000 UHPLC Liquid Chromatography chain linked to a Thermo Exactive Mass Spectrometer

LC-MS (electrospray ionization)

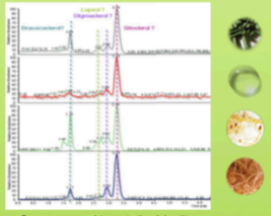
Analysis of secondary metabolites



« ? » correspond to putative identity

LC-MS (atmospheric pressure chemical ionization)

Search for steroïds and saponins



« ? » correspond to putative identity

Preliminary experiments performed with solubilized sainfoin granules extracts strongly suggest a nematicide effect, which needs to be confirmed. Root exudates show lower but significant nematicide activity, probably linked to the low concentration of active molecules. A first non-targeted metabolomic analysis of sainfoin roots, aerial parts and root exudates revealed the presence of steroïds, terpenes and a great diversity of flavonoids, which are putative candidates for nematicide molecules. An experiment in the vineyard is currently carried out in order to evaluate the effect of sainfoin in interculture after fanleaf degeneration epidemy.

The subsequent experiments will consist in the isolation and identification of nematicide molecules, by LC-MS analyzes and fractionation of the molecular mixture, combined with bioassays. The experimental approach developed with sainfoin will be applied to other potentially nematicide plants (medicago, lotier, red clover, hairy vetch).

Université de Strasbourg , INRA, SVQV UMR-A 1131, F-68000 Colmar, France
http://www.colmar.inra.fr
* Corresponding author: lise.negrel@inra.fr

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES – A SOUMETTRE DANS LES 3 MOIS

Lise Negrel, Raymonde Baltenweck, Gérard Demangeat, Philippe Hugueney & Olivier Lemaire. **Metabolomic analysis of three Fabaceae and their potential use as bionematicide fallows against the nematode *Xiphinema index*, vectoring fanleaf disease to grapevine.**

Lise Negrel, Gérard Demangeat & Olivier Lemaire. **Antagonistic effects of the nematoparasitic fungus *Catenaria anguillulae* on the soil-borne longidorid nematode *Xiphinema index* transmitting grapevine fanleaf virus to grapevine.**